



Sónia Alexandra Pereira da Silva

Licenciada

Caracterização *in vitro* de siRNAs ionicamente modificados

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética
Molecular e Biomedicina

Orientador: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Doutora (FCT/UNL)

Coorientador: Isabel Maria Godinho de Sá Nogueira, Professora
Doutora (FCT/UNL)

Pedro Vidinha, Doutor (FCT/UNL)

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves

Arguente: Doutor Pedro Miguel Martinho Borralho

Vogal: Prof.^a Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2012

Caracterização *in vitro* de siRNAs ionicamente modificados

Copyright Sónia Silva, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educativos ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me apoiaram neste percurso e que, de algum modo contribuíram para a realização desta tese.

À minha orientadora, Prof. Doutora Alexandra Fernandes e à minha coorientadora Prof. Doutora Isabel Sá Nogueira por todo o empenho, dedicação e disponibilidade total demonstradas ao longo de todo este último ano. Obrigada por todos os ensinamentos e pela forma inalcançável como me foram orientando ao longo deste meu percurso. O apoio que me foram dando foi essencial para crescer como investigadora. Muito obrigada pelo tempo despendido comigo e com a revisão deste trabalho. O vosso contributo foi determinante para ter alcançado os resultados aqui apresentados.

Ao meu coorientador, Doutor Pedro Vidinha pela confiança que sempre depositou no meu trabalho e por me ter ensinado que a ciência faz-se não só de conhecimento, mas também de entusiasmo, sonho e amor pelo que se faz. Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos e pelo apoio incondicional dado ao longo de todo o projeto.

Ao Prof. Doutor Pedro Baptista, do grupo de investigação *Nanotheranostics* do Centro de Investigação em Genética Molecular Humana por me ter permitido a realização de ensaios de quantificação no seu laboratório. Agradeço também por todas as ideias discutidas que tanto contribuíram para este trabalho e para a minha experiência científica.

À Prof. Doutora Susana Barreiros, por me ter dado oportunidade de integrar o grupo de *Biocatalysis and Bioenergy*.

À Diana Garcia por todos os ensinamentos na área dos líquidos iónicos, mais particularmente na síntese dos siRNAs ionicamente modificados. Obrigada pela disponibilidade constante para me esclareceres dúvidas, pela motivação e boa disposição que sempre demonstraste. A tua ajuda foi essencial para que me entusiasmasse com este projeto e para que compreendesse os conceitos básicos que envolvem a área dos líquidos iónicos.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Cláudia, Ana Silva, Daniel, Helena, Joana, Luís, Marina, Patrícia e Vanda pelo companheirismo e pelo apoio dado durante todo o ano. Obrigada ao Daniel pelas dicas, sugestões e correções que se revelaram tão úteis. Muito obrigada à Ana Silva por me ter acompanhado ao longo do ano e por me ter ensinado tudo o que sei sobre linhas celulares. Obrigada pela força, pelos constantes incentivos, pelas dicas, sugestões e correções que tanto contribuíram para melhorar o trabalho final aqui apresentado.

A todos os meus colegas do laboratório de Genética Microbiana (Raquel incluída) por tão bem me terem recebido no seu grupo de investigação e pela boa-disposição constante. Um sincero obrigada à Lia e à Isabel por toda a ajuda laboratorial que sempre me deram. A vossa experiência e capacidade de ensinar fizeram-me crescer como investigadora e o resultado final apresentado nesta tese reflete em muito todos os conhecimentos que me foram transmitindo.

Ao Bruno, ao Fábio, ao João Conde e ao Miguel Larguinho do grupo de investigação *Nanotheranostics* do centro de investigação em Genética Molecular Humana pela ajuda prestada durante os ensaios de quantificação. Ao João Conde pelos ensinamentos transmitidos e pela disponibilidade que sempre demonstrou em ajudar-me.

A todos os meus colegas do grupo de *Biocatalysis and Bioenergy* por me terem acolhido tão bem neste laboratório. Ao Doutor Alexandre Paiva, pela simpatia e pela disponibilidade que sempre demonstrou para me ajudar em tudo o que estivesse ao seu alcance. À Rita Rodrigues, pela simpatia, por todos os conselhos e conversas que fomos tendo ao longo deste ano. À Andreia, à Cármen, à Rita Craveiro, à Sílvia, à Tânia e à Vera pelo interesse e preocupação que sempre demonstraram pelo meu trabalho, pela força que sempre me deram e por tantas risadas que me arrancaram, mesmo em dias menos bons. A todos vocês, um obrigada muito especial por tantos bons momentos partilhados no laboratório e fora dele e pelo espírito de união que mantêm no 427.

A todos os amigos que partilharam todas as alegrias e vicissitudes destes dois anos em Lisboa. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos excelentes jantares e momentos de diversão e por se manterem firmes em aturar-me, por menos vezes que seja. À Ana Isabel, pela amizade e pelo companheirismo demonstrado ao longo destes 2 últimos anos. Obrigada pela companhia diária, pelas risadas e cantorias à hora do jantar, pelos (poucos) passeios em descoberta de lugares desconhecidos nesta cidade, por teres estado presente nos bons e maus momentos e por toda a força que me foste dando ao longo de todo este ano de trabalho laboratorial. Sem ti as coisas seriam bem mais difíceis.

A todos os que, apesar do tempo e da distância estão sempre presentes, dando um significado tão importante à palavra Amizade. Ao André, ao Fábio e à Rita pela capacidade de me fazerem rir e por estarem sempre aí para ouvir os meus desabafos e os meus disparates. À Diana, por todos os momentos que partilhámos ao longo destes anos todos e que em muito contribuíram para me tornar na pessoa que sou. À Guida, pela disponibilidade total para trocar ideias e pelos telefonemas sempre animados que tantas vezes me deram alento para continuar a trabalhar ainda com mais força. Ao Luís, por nunca ter deixado de acreditar, por toda a

ajuda no que aos computadores diz respeito e porque, mesmo longe se manteve sempre perto. São pessoas como vocês que me fazem ter saudades das cidades por onde já passei, esperando sempre ter oportunidade de vos poder visitar.

Por último, mas não menos importante, a toda a minha família e em especial aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida, por me fazerem sentir que nunca estou sozinha e por todos os valores que sempre me transmitiram. Sem vocês, nada faria sentido.

Resumo

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo celular que através de pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNA) promove o silenciamento pós-transcricional de genes. Os siRNA são moléculas com 20 – 25 pares de bases que nos últimos anos se têm assumido como potenciais agentes terapêuticos para silenciar genes associados a doenças em humanos. No entanto, têm-se interposto algumas barreiras fisiológicas que têm limitado o uso de siRNA na prática clínica. Um dos grandes obstáculos encontrados no uso destas moléculas como agentes terapêuticos é a sua grande instabilidade, pelo que, neste projeto, se considerou a utilização de nucleótidos ionicamente modificados para a síntese *in vitro* de siRNAs.

Este trabalho tinha como principal objetivo caracterizar *in vitro* siRNAs ionicamente modificados. Os resultados obtidos mostraram ser possível obter moléculas de siRNAs com elevado grau de pureza o que nos levou a transfetar os siRNAs em células MCF-7 que expressam constitutivamente o gene *eGFP*. A eficiência de silenciamento dos siRNAs modificados e não modificados foi avaliada por microscopia de fluorescência e por espectrofluorimetria, tendo-se verificado que o nível de silenciamento promovido pelas moléculas testadas era muito semelhante. Além disso, estudos de viabilidade celular permitiram inferir que os siRNAs testados não promoviam citotoxicidade nas células transfetadas.

Com este trabalho espera-se contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias que permitam a implementação de siRNAs ionicamente modificados como medida terapêutica mais eficaz, estável e económica.

Palavras chave: RNA não codificantes; RNA de interferência; siRNA; Líquidos iónicos; terapia génica

Abstract

The RNA interference (RNAi) is a cellular mechanism that, through small interference RNA molecules (siRNA) promotes post-transcriptional silencing of genes. The siRNA are 20-25 bp molecules and in recent years have been assumed as potential therapeutic agents to silence genes associated with human diseases. However, there have been some physiological barriers that have limited the use of siRNA in clinical practice. One of the major issues that are involved in using these molecules as therapeutic agents is their great instability. Thus, in this project, we have considered the use of ionically modified nucleotides for the synthesis of siRNAs *in vitro*.

Our main goal of this project was to characterize *in vitro* ionically modified siRNAs. The results achieved during this last year proved to be possible to obtain siRNAs molecules with high purity level. This fact led us to transfect siRNAs in MCF-7 cells constitutively expressing *eGFP* gene. The silencing efficiency of modified and unmodified siRNAs was assessed by fluorescence microscopy and by spectrofluorimetry. Through these assays, it was found that the level of silencing promoted by the tested molecules was very similar. Moreover, cell viability studies allowed us to infer that the tested siRNAs didn't promote cytotoxicity in transfect cells.

With this study we expect to contribute to the development of new strategies which enable the implementation of ionically modified siRNAs as a more efficient, stable and economical therapeutic measure.

Keywords: Non coding RNA; RNA interference; siRNA; Ionic liquids; gene therapy

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xiii
Abreviaturas.....	xv
Lista de unidades.....	xvii
1 Introdução.....	1
1.1 RNA não codificantes.....	1
1.2 RNA de interferência.....	1
1.3 siRNAs.....	3
1.4 siRNA: aplicações e potencial terapêutico.....	5
1.5 Barreiras à aplicação de siRNAs para fins terapêuticos.....	7
1.5.1 Estabilidade.....	7
1.5.2 <i>Uptake</i> celular.....	8
1.5.3 Silenciamento não específico.....	8
1.5.4 Toxicidade.....	8
1.6 Líquidos Iônicos.....	10
1.7 Objetivos do trabalho.....	11
2 Materiais e Métodos.....	13
2.1 Extração e purificação de DNA plasmídico.....	13
2.2 Desenho de <i>primers</i> para a amplificação do gene <i>eGFP</i> por PCR.....	14
2.3 Síntese de siRNAs.....	15
2.3.1 Amplificação do DNA molde para transcrição <i>in vitro</i>	15
2.3.2 Síntese de dsRNAs.....	16
2.4 Manutenção da linha celular em estudo (MCF-7).....	17
2.5 Determinação da concentração celular.....	18
2.6 Transfecção de siRNAs.....	19
2.7 Estudos de viabilidade celular.....	19
2.7.1 MTS/ PMS.....	19
2.8 Quantificação dos níveis de expressão da eGFP.....	20
2.8.1 Fluorimetria.....	20
2.8.2 Quantificação dos níveis de proteína total nas amostras.....	20
2.9 Reação de transcriptase reversa seguida de PCR.....	21
2.9.1 Extração do RNA total de células MCF-7.....	21
2.9.2 Síntese de cDNA e PCR.....	21
3 Resultados e discussão.....	23

3.1	Extração e purificação de DNA plasmídico	23
3.2	Síntese de siRNA.....	25
3.3	Avaliação dos níveis de expressão da eGFP	28
3.3.1	Transfeção	28
3.3.2	Quantificação dos níveis de expressão da eGFP	32
3.4	Estudos de viabilidade celular.....	35
3.5	Reação de transcriptase reversa seguida de PCR	38
4	Conclusões e perspectivas futuras	41
5	Bibliografia.....	43
6	Anexos.....	49

Índice de figuras

Figura 1.1 Via do RNAi	3
Figura 1.2 - Percursos de siRNA.....	4
Figura 1.3 Principais obstáculos e aplicações dos siRNAs	9
Figura 1.4 Estrutura química da molécula de ATP e de ATP ionicamente modificado (ATP-PEG)....	11
Figura 3.1 Perfil de DNA obtido por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) após a digestão do plasmídeo pcDNA3_eGFP com a enzima de restrição EcoRI.	23
Figura 3.2 Perfil de DNA obtido por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) M- marcador molecular <i>Hyperladder IV</i> . C ⁻ - Controlo negativo; 1-eGFP amplificado a 56°C com par de <i>primers</i> GFP1 2- eGFP amplificado a 57°C com par de <i>primers</i> GFP1; 3- eGFP amplificado a 56°C com par de <i>primers</i> GFP2, 4- eGFP amplificado a 57°C com par de <i>primers</i> GFP2.....	24
Figura 3.3 Representação esquemática do processo de síntese de siRNAs.....	25
Figura 3.4 Análise electroforética dos dsRNA obtidos por transcrição <i>in vitro</i> em gel de agarose 1%(m/v).....	26
Figura 3.5 Análise electroforética, através de gel de poliacrilamida 20% (m/v), durante 3,5 h a 110 V, de siRNAs obtidos após a digestão de dsRNA por uma RNase III.	27
Figura 3.6 Células MCF-7/eGFP 48h após a transfeção com os siRNAs comerciais na presença de 7,5 µL de lipofectamina, vistas ao microscópio num filtro de fluorescência com uma ampliação de 10x.....	29
Figura 3.7 Células MCF-7/eGFP observadas no filtro de fluorescência e em campo claro, com uma ampliação de 10x, com 7,5 µL de lipofectamina e 10 nM de siRNA comercial (à esquerda) e 35 nM de siRNA comercial (à direita).	30
Figura 3.8 Imagens de MCF-7/eGFP observadas ao microscópio através de um filtro de fluorescência e de campo claro, com uma ampliação de 20x.	31
Figura 3.9 Reta padrão aplicada à determinação da quantidade de proteína total presente nas células transfetadas e células controlo.....	32
Figura 3.10 Variação dos níveis de expressão da eGFP, determinado 48h depois da transfeção com diferentes quantidades de <i>Lipofectamine</i> [®] <i>RNAiMAX</i> e de diferentes concentrações de siRNAs.....	33
Figura 3.11 Variação do nível de expressão de eGFP após a transfeção das células MCF-7 com 1 µL de <i>Lipofectamine</i> [®] <i>RNAiMAX</i> e com várias concentrações de siRNA comercial, siRNA_ATP e siRNA_PEG.	34

Figura 3.12 Viabilidade celular após a transfeção de células MCF-7/eGFP com diferentes volumes de lipofectamina.....	36
Figura 3.13 Viabilidade celular após a transfeção de células MCF-7/eGFP com diferentes volumes de <i>Lipofectamine</i> [®] <i>RNAiMAX</i> e concentrações crescentes de siRNAs comerciais.....	37
Figura 3.14 Viabilidade celular após a transfeção de células MCF-7/eGFP com diferentes volumes de <i>Lipofectamine</i> [®] <i>RNAiMAX</i> e concentrações crescentes de siRNAs comerciais.....	37
Figura 3.15 Perfil de cDNA obtido por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) M- marcador molecular <i>Hyperladder IV</i> . 1- gene <i>ACTB</i> amplificado com pares de <i>primers</i> específicos. 2- <i>eGFP</i> amplificado com par de <i>primers</i> GFP1	38

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Ensaios clínicos que testam siRNAs como agentes terapêuticos	5
Tabela 2.1 Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificar o gene que codifica para a eGFP (Anexo 2).....	14
Tabela 2.2 Programa de PCR utilizado para amplificar o gene que codifica para a eGFP	14
Tabela 2.3 Sequência dos <i>primers</i> usados na reação de PCR. A sequência do promotor T7 encontra-se sublinhada.....	15
Tabela 2.4 Programa de PCR utilizado para amplificar o gene <i>eGFP</i> que funcionará como DNA molde na reação de transcrição <i>in vitro</i>	15
Tabela 2.5 Sequência dos primers utilizados para amplificar o gene <i>ACTB</i> que codifica para a β -actina	22

Abreviaturas

Abs	Absorvância
AGO	Proteína Argonauta
ATP	Adenosina trifosfato
ATP-PEG	Adenosina trifosfato modificada com uma molécula de polietilenoglicol
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
CTP	Citosina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
DMRI	<u>D</u> egeneração <u>M</u> acular <u>R</u> elacionada com a <u>I</u> dade
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleósidos tri-fosfato
dsRNA	Ácido ribonucleico em cadeia dupla (do inglês <i>double strand ribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic Acid</i>)
eGFP	Proteína verde fluorescente melhorada (do inglês <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O	Água
HBV	Vírus da hepatite B (do inglês <i>Hepatitis B Virus</i>)
HCT116	Linha celular de cancro coloretal humano
HCV	Vírus da hepatite C (do inglês <i>Hepatitis C Virus</i>)
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LI	<u>L</u> íquidos <u>I</u> ônicos
LMC	<u>L</u> eucemia <u>M</u> ielóide <u>C</u> rónica
MCF-7	Linha celular do cancro de mama humano (acrónimo de <i>Michigan Cancer Foundation 7</i>)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
miRNA	microRNA
MnCl ₂	Cloreto de manganês
MQ H ₂ O	Água MiliQ
mRNA	RNA mensageiro
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

NaCl	Cloreto de Sódio
ncRNA	RNA não codificante (do inglês <i>non-coding RNA</i>)
NTP	Nucleósido trifosfato
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pDNA	DNA plasmídico
PEG	Polietilenoglicol
piRNA	RNAs que interagem com a proteína Piwi
PMS	Metossulfato de fenazina (do inglês <i>phenazine methosulfate</i>)
RISC	Complexo indutor de silenciamento de RNA (do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	Transcrição Reversa PCR (do inglês <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>)
siRNA	Pequeno RNA de interferência (do inglês <i>small interfering RNA</i>)
TAE	<u>T</u> ris <u>A</u> cetato <u>E</u> DTA
TBE	<u>T</u> ris <u>B</u> orato <u>E</u> DTA
TE	<u>T</u> ris <u>E</u> DTA
UTP	Uridina trifosfato
VSR	<u>V</u> írus <u>S</u> incicial <u>R</u> espiratório

Lista de unidades

°C	Graus Celsius
H	Hora
G	Grama; mg – miligrama (10^{-3} g); μ g – micrograma (10^{-6} g)
L	Litro; mL - mililitro (10^{-3} L), μ L - microlitro (10^{-6} L)
M	Metro; cm – centímetro (10^{-2} m), mm - milímetro (10^{-3} m), nm – nanómetro (10^{-9} m)
M	Molar (mol/L); mM - milimolar (10^{-3} M), μ M - micromolar (10^{-6} M)
Mol	Mole
min	Minuto
rpm	Rotações por minuto
S	Segundo
% (m/v)	Percentagem massa/volume
% (v/v)	Percentagem volume/volume

1 Introdução

1.1 RNA não codificantes

Durante muito tempo, o RNA foi visto como uma molécula meramente intermediária na síntese de proteínas funcionais a partir do DNA. No entanto, a descoberta de que o RNA não é somente responsável pela transmissão de informação genética, mas também está envolvido em processos celulares de regulação de genes, veio despoletar um crescente interesse em compreender melhor o papel desta molécula no metabolismo da célula. Assim, beneficiando do desenvolvimento de novas tecnologias na área da Biologia Molecular, surgiu a RNômica, uma área que estuda os RNAs funcionais e as suas interações ao nível do genoma (Arraiano e Fialho, 2007).

Nos últimos anos, a investigação na área da RNômica tem permitido caracterizar vários RNAs funcionais que nunca dão origem a proteínas e que por serem normalmente de pequena dimensão são designados pequenos RNA não codificantes (ncRNA, do inglês *noncoding RNA*). Apesar de estarem intimamente relacionados e de partilharem algumas características, os ncRNA diferem entre si em aspetos como a biogénese, modo de regulação génica ou funções biológicas em que estão envolvidos (Ghildiyal e Zamore, 2009; Golden et al., 2008). Neste contexto, os ncRNA são comumente classificados em três categorias principais: microRNAs (miRNA), RNAs que interagem com a proteína Piwi (piRNA) e pequenos RNAs de interferência (siRNA, do inglês *small interfering RNA*) (Carthew e Sontheimer, 2009; Ghildiyal e Zamore, 2009). As duas primeiras classes de ncRNA citadas (miRNA e piRNA) não serão abordadas nesta dissertação por não fazerem parte do âmbito deste trabalho.

Segundo estudos recentes, os pequenos ncRNA podem regular ativamente a expressão génica, estando envolvidos em várias processos biológicos nomeadamente na formação e regulação da estrutura da cromatina e na regulação pós-transcricional e traducional de genes (Kaikkonen et al., 2011; Mattick e Makunin, 2006).

No final de 2002, o estudo deste vasto grupo de pequenos ncRNA e do seu papel na via de interferência foi considerado o maior avanço da ciência pela revista *Science*, sendo ainda uma das áreas da investigação mais atrativas, principalmente devido ao potencial terapêutico destas moléculas (Couzin, 2002; Davidson e McCray, 2011).

1.2 RNA de interferência

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento pós-transcricional de genes (Fire et al., 1998). Evolutivamente conservado e praticamente ubíquo no mundo biológico, o RNAi foi descoberto em 1998 pelo grupo de investigação de Andrew Fire e Ciriaco

Mello, os quais receberam em 2006 o prêmio nobel da medicina e fisiologia pelo trabalho desenvolvido nesta área (Leung e Whittaker, 2005; Whitehead et al., 2009).

Desde que foi descoberta a via do RNAi, vários estudos foram realizados para perceber o seu papel no metabolismo celular, verificando-se que esta é uma importante ferramenta na defesa antiviral, bem como na regulação da expressão gênica e na estabilidade do genoma (Ghildiyal e Zamore, 2009).

Na natureza, a via do RNAi (Figura 1.1) é desencadeada pela presença de moléculas de RNA em cadeia dupla (dsRNA, do inglês *double-stranded DNA*) no citoplasma que são reconhecidas pela endonuclease Dicer, que por sua vez promove a sua clivagem em fragmentos com cerca de 20-25 pb, denominados siRNA. Os siRNA são então incorporados num complexo multiproteico inativo conhecido como complexo silenciador induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-Induced Silencing Complex*). Os componentes que constituem o RISC, bem como o seu tamanho não foram até hoje caracterizados na íntegra, pelo que a forma como este complexo multiproteico intervém no mecanismo do RNAi ainda não é completamente conhecido (Gaynor et al., 2010). Contudo, vários estudos têm ajudado a esclarecer o papel do RISC no silenciamento de genes. Assim, Antti Nykänen e colegas demonstraram que, após ser incorporada no RISC inativo, a cadeia dupla de siRNA é desnaturada por uma helicase, num processo dependente de ATP. A dissociação da cadeia dupla leva à libertação e clivagem da cadeia *sense* (cadeia passageira) e à ativação do complexo RISC (Nykanen et al., 2001).

Uma vez ativado, o RISC é direcionado pela cadeia *antisense* (cadeia guia) que reconhece e se liga à cadeia de mRNA alvo. Após a ligação da cadeia guia ao mRNA alvo, e dependendo da complementaridade entre ambos, dá-se a clivagem do mRNA alvo ou a repressão da sua tradução por ação de proteínas da família Argonauta (AGO) o que resulta no silenciamento do gene alvo (Hutvagner and Simard, 2008). O número de proteínas AGO varia entre diferentes organismos, tendo sido encontrados 10 homólogos em *Arabidopsis thaliana*, 8 em humanos e 5 em *Drosophila melanogaster* (para citar alguns exemplos) (Filipowicz et al., 2005). No entanto, nem todas as formas identificadas provaram ser cataliticamente ativas. Veja-se o caso dos humanos em que, dos 8 homólogos de AGO identificados, apenas uma, a AGO2, provou ser capaz de se ligar ao RISC e induzir uma clivagem competente do mRNA alvo (Liu et al., 2004). A ausência de atividade catalítica em algumas proteínas da família AGO parece constituir uma prova de divergência evolutiva e de diferentes afinidades de proteínas AGO ou da maquinaria que incorpora os ncRNA para diferentes moléculas de RNA. Um exemplo representativo verifica-se em *Drosophila* em que siRNAs endógenos e perfeitamente complementares são incorporados pela proteína AGO2, promovendo a clivagem do mRNA alvo, enquanto miRNAs que apresentam um elevado número de bases não emparelhadas tendem a ser incorporados pela AGO1, levando à inibição da tradução do mRNA alvo (Ghildiyal e Zamore, 2009; Hutvagner e Simard, 2008).

Independentemente da complementaridade entre a cadeia guia e o mRNA alvo, ou seja, independentemente se há clivagem ou repressão da tradução do mRNA, os fragmentos resultantes são

libertados do RISC que assim pode ser reutilizado para clivar novas cadeias de mRNA alvo (Gaynor et al., 2010).

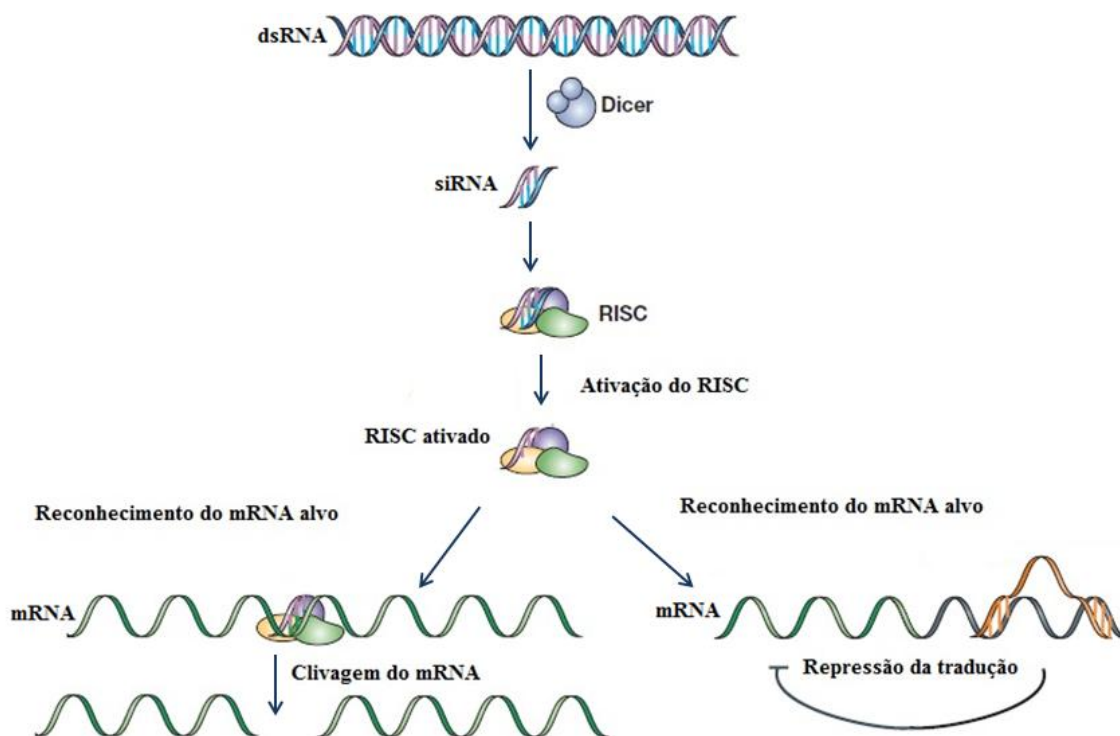


Figura 1.1 Via do RNAi

As moléculas de RNA em cadeia dupla (dsRNA) no citoplasma são reconhecidas pela endonuclease Dicer. Esta enzima promove a clivagem dos dsRNA em pequenos fragmentos com cerca de 20-25 pb, denominados siRNAs, os quais são incorporados num complexo multiproteico inativo conhecido como complexo silenciador induzido por RNA (RISC). Após ser incorporado no RISC inativo, a cadeia dupla de siRNA é desnaturada por uma helicase levando à libertação da cadeia *sense* e à ativação do RISC. Uma vez ativado, o RISC é direcionado pela cadeia *antisense* que reconhece e se liga à cadeia de mRNA alvo. Após a ligação da cadeia guia ao mRNA alvo, e dependendo da complementaridade entre ambos, dá-se a clivagem do mRNA alvo ou a repressão da sua tradução o que resulta no silenciamento do gene alvo. (Adaptado de Dykxhoorn et al., 2003)

1.3 siRNAs

Os siRNA foram pela primeira vez observados em plantas por Hamilton e Baulcombe (Hamilton and Baulcombe, 1999). Atualmente, estes ncRNA foram já descritos em vários organismos nomeadamente fungos, nemátodes, protozoários, insetos e mamíferos (Carthew e Sontheimer, 2009; Taft et al., 2010).

Os siRNA são moléculas lineares que têm normalmente 20 – 25 pares de bases (pb), sendo por muitos consideradas as moléculas efetoras da via de RNAi (Dorsett e Tuschl, 2004; Kaikkonen et al., 2011). Durante muitos anos pensou-se que os siRNA teriam origem exclusivamente exógena, podendo os seus precursores (Figura 1.2) ser sintetizados *in vitro* ou *in vivo* a partir de RNA viral ou sequências repetitivas (Ghildiyal e Zamore, 2009; Tang, 2005). No entanto, tem sido demonstrado que os siRNA

podem também ser sintetizados naturalmente pela célula (Figura 1.2), tendo sido provada a sua existência tanto em células somáticas como em células da linha germinativa. (Czech et al., 2008; Ghildiyal et al., 2008; Watanabe et al., 2006) Estudos recentes mostraram que os siRNA podem ter origem não só em material genético proveniente do meio extracelular, como também em substratos endógenos como por exemplo pseudogenes, regiões intergênicas, transcritos antisense, sequências móveis e/ou repetitivas ou mesmo mRNA aberrantes ou produzidos em excesso na célula. (Ghildiyal e Zamore, 2009; Golden et al., 2008; Llave et al., 2002; Moazed, 2009; Okamura e Lai, 2008). A descoberta de siRNA endógenos (endo-siRNA) permitiu à comunidade científica tirar elações importantes sobre o papel dos siRNA na regulação da expressão génica. Desta forma, os siRNA parecem estar envolvidos em mecanismos de defesa antiviral, na regulação pós-transcricional de genes, na manutenção da integridade do genoma e na formação e controlo da estrutura da cromatina (Ding e Voinnet, 2007; Ghildiyal e Zamore, 2009; Grewal, 2010; Tang, 2005; Xie et al., 2004; Zilberman et al., 2003).

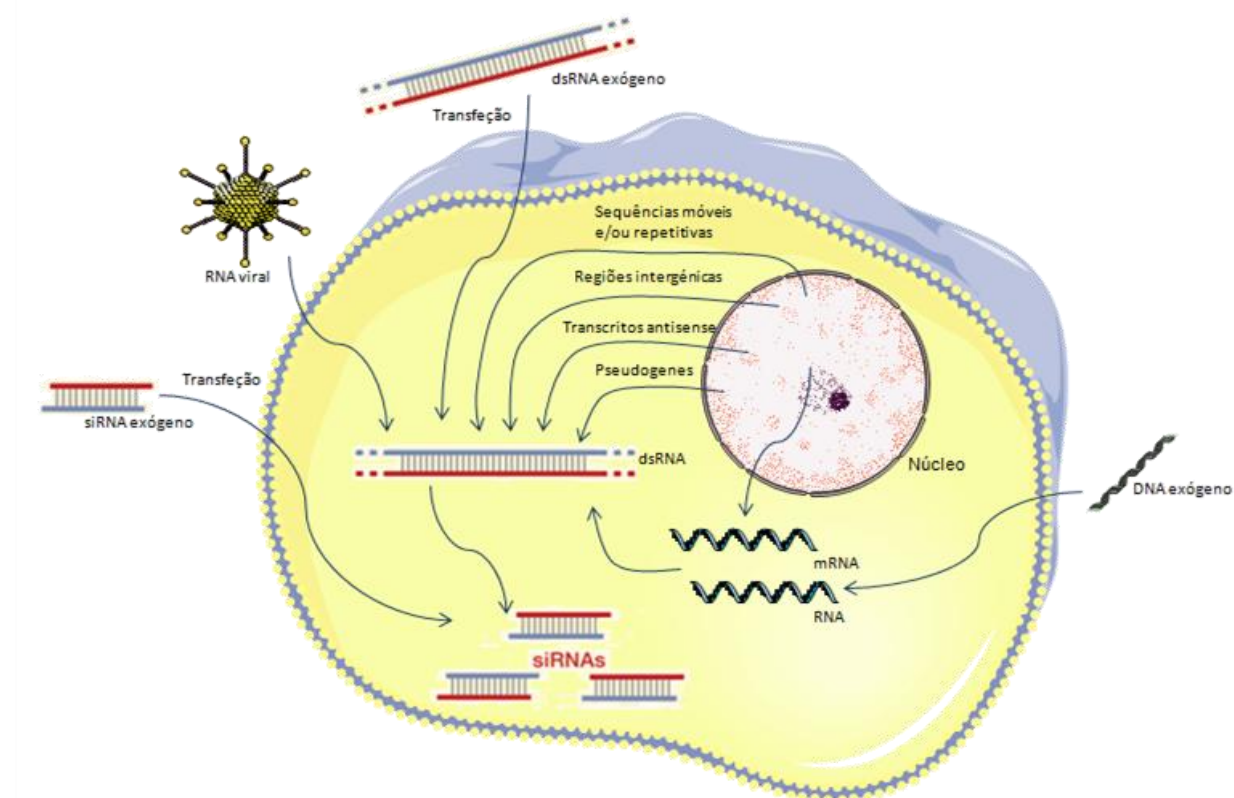


Figura 1.2 - Percursos de siRNA.

Os primeiros estudos em plantas e em *Caenorhabditis elegans* indicavam que os siRNA teriam origem exclusivamente exógena. Neste contexto, as moléculas de siRNA seriam moléculas de RNA em cadeia dupla produzidas *in vitro* ou *in vivo* a partir de RNA viral ou a partir de transposões ou sequências repetitivas e introduzidos no meio citoplasmático por técnicas de engenharia genética (como a transfecção). No entanto, têm sido descritos em modelos animais (nomeadamente em *Drosophila melanogaster* e em ratinhos) precursores de siRNA de origem endógena. Assim, é agora consensual que os siRNA podem ser produzidos não só a partir de material genético proveniente do meio extracelular, como também a partir de substratos intramoleculares como por exemplo pseudogenes, regiões intergênicas, transcritos antisense, sequências móveis e/ou repetitivas ou mesmo de mRNA aberrantes ou produzidos em excesso (Ghildiyal e Zamore, 2009; Llave et al., 2002; Okamura e Lai, 2008; Tang, 2005).

1.4 siRNA: aplicações e potencial terapêutico

A compreensão dos mecanismos de silenciamento do RNA e do papel que os siRNA assumem neste processo, teve um grande impacto na área da genômica funcional, permitindo o desenvolvimento de novas abordagens para o estudo de genes e da sua função na célula (Hannon e Rossi, 2004). Assim, ativando a via de interferência em diferentes linhas celulares e analisando os efeitos fenotípicos causados pelo silenciamento de genes de interesse, vários grupos de investigação conseguiram identificar o papel de genes associados a processos celulares fundamentais como a divisão celular, apoptose ou morfologia celular (Dorsett e Tuschl, 2004). Foi o caso do gene *CP110* cujo papel no ciclo celular foi descortinado por Chen e seus colegas e do gene *DBC2*, um supressor tumoral que está envolvido não só na regulação do ciclo celular, como também na regulação da apoptose e de vias de tráfego de membranas (Chen et al., 2002; Siripurapu et al., 2005).

Ao revelar-se uma ferramenta tão importante no silenciamento específico de genes de interesse, os siRNAs começaram a ser vistos tanto pela comunidade científica como pela indústria farmacêutica como potenciais agentes terapêuticos para silenciar genes associados a doenças em humanos (Dillon et al., 2005; Tokatlian e Segura, 2010). Neste sentido, têm sido alcançados resultados promissores (Tabela 1.1) na utilização de siRNA como agentes terapêuticos nomeadamente em cancro, doenças infecciosas, respiratórias, autoimunes ou doenças neurodegenerativas (Davidson e McCray, 2011; Edelstein et al., 2007; Leung e Whittaker, 2005).

Tabela 1.1 Ensaios clínicos que testam siRNAs como agentes terapêuticos

Companhia	Doença-alvo	Fase de ensaios clínicos
Alnylan Pharmaceuticals	Infeção por RSV	Fase II
Alnylan Pharmaceuticals	Amiloidose Trantiretina	Fase II
Silence Therapeutics	DMRI	Fase II
Silence Therapeutics	Inflamação Renal Aguda	Fase I
Benitec	Cancro do pulmão	Fase pré-clínica

Em 2005, os siRNAs foram pela primeira vez utilizados, com sucesso, em ensaios clínicos. Desta feita, uma empresa de biotecnologia americana reportou a conclusão da primeira fase de ensaios clínicos utilizando moléculas de siRNA como agentes terapêuticos para degeneração macular relacionada com a idade (DMRI) (Edelstein et al., 2007). Entretanto, vários programas direcionados para o tratamento desta doença foram iniciados, estando em curso ensaios clínicos para avaliar a segurança e eficácia dos siRNA propostos como agentes terapêuticos (Davidson e McCray, 2011).

Na área do cancro, os siRNA têm sido utilizados para reduzir a expressão de oncogenes nomeadamente do gene *BCR-ABL*, o qual codifica uma proteína (tirosina cinase) que induz leucemia mieloide crónica (LMC) (Stevenson, 2004). Wilda e os seus colegas mostraram que siRNAs direcionados contra o mRNA resultante da transcrição do oncogene *BCR-ABL* induziram níveis de apoptose em células leucémicas semelhantes aos induzidos pelo tratamento convencional comumente utilizado em doentes com LMC (Wilda et al., 2002). Uma vez que já foram documentados vários casos em que, em fases avançadas da doença, alguns doentes desenvolveram resistência ao medicamento usado convencionalmente, estes resultados reforçam a importância da aposta no desenvolvimento de siRNAs que possam ser utilizados em terapia génica (Ryther et al., 2005).

Os resultados obtidos no desenvolvimento de terapias antivirais baseadas no mecanismo de RNAi têm confirmado o potencial terapêutico atribuído aos siRNAs. De facto, vários grupos de investigação têm demonstrado para diferentes vírus que os siRNAs são capazes de inibir a sua expressão e/ou replicação (Aagaard e Rossi, 2007). Um dos exemplos mais sonantes é o da utilização de siRNAs no tratamento de infeções provocadas pelo vírus sincicial respiratório (VSR). Num estudo *in vitro*, Zhang e os seus colegas observaram que, comparativamente a ratinhos controlo, ratinhos tratados com siRNAs direcionados contra o gene *NS1*, um gene essencial na replicação de VSR, evidenciavam um decréscimo substancial de título viral nos pulmões (Zhang et al., 2005). Atualmente, siRNAs contra o gene nucleocápside “N” do genoma do VSR, também ele envolvido na replicação do vírus, têm sido testados com sucesso em ensaios clínicos que visam o tratamento de infeções do trato respiratório (Davidson e McCray, 2011; www.alnylam.com). Outros vírus têm sido alvo de estudos para o desenvolvimento de siRNAs que possam ser utilizados para fins terapêuticos. Entre vários exemplos que poderiam ser aqui citados, destacam-se o vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), principalmente porque os tratamentos disponíveis contra estes vírus têm-se mostrado inadequados e pouco eficientes (Ashfaq et al., 2011; Uprichard, 2005). No sentido de avaliar a eficiência de siRNAs no tratamento de doenças hepáticas causadas por HBV e HCV, diferentes grupos de investigação direcionaram siRNAs contra genes mediadores da apoptose em hepatócitos. Nestes estudos verificou-se que o pré-tratamento de ratinhos com siRNAs contra a caspase 8 ou contra os recetores de morte celular, Fas, os protegia de desenvolver hepatite fulminante (Song et al., 2003; Zender et al., 2003). Estes resultados criaram elevadas expectativas quanto à possibilidade de usar siRNAs no tratamento de doentes com hepatite fulminante e outras doenças relacionadas. No entanto, a elevada taxa de mutação durante a replicação viral tem constituído um importante obstáculo à obtenção de bons resultados. Mesmo assim, vários progressos têm sido alcançados, havendo já ensaios clínicos em curso para o tratamento de hepatite C (por HCV) e hepatite B (por HBV) (Davidson e McCray, 2011).

Os bons resultados obtidos em estudos iniciais confirmaram as propriedades farmacocinéticas dos siRNAs, que assim se assumiram definitivamente como potenciais agentes a ser utilizados em

terapia génica. No entanto, algumas dificuldades têm-se interposto na utilização de siRNAs na prática clínica, nomeadamente a sua instabilidade, a sua inespecificidade, dificuldade em chegar ao tecido/órgão alvo, entre outras (Tokatlian e Segura, 2010; Whitehead et al., 2009).

1.5 Barreiras à aplicação de siRNAs para fins terapêuticos

1.5.1 Estabilidade

A estabilidade dos siRNA como agentes terapêuticos *in vivo* continua a ser um dos maiores obstáculos à utilização destes oligonucleótidos como fármaco sistémico. Teoricamente, sendo moléculas em cadeia dupla, os siRNA deveriam ser mais resistentes à degradação do que moléculas de RNA em cadeia simples. No entanto, a utilização sistémica de siRNA tem sido dificultada por vários processos biológicos que de uma maneira ou de outra impedem que estas moléculas atinjam *in vivo* os mRNA de interesse e por isso não consigam silenciar a sua tradução (Gaynor et al., 2010; Whitehead et al., 2009).

Um dos grandes obstáculos à utilização de siRNA na terapia génica é a sua rápida degradação enzimática pelas RNases presentes quer no plasma humano quer no meio intracelular (Gaynor et al., 2010; Tokatlian e Segura, 2010). Por outro lado, a presença de células fagocitárias na corrente sanguínea constitui também uma importante forma de degradação de siRNAs. Note-se que estas células, envolvidas normalmente na resposta imunitária, participam na proteção contra infeções provocadas por vírus, bactérias e/ou fungos. Assim, removem do organismo qualquer material que não reconheçam como endógeno ou que reconheçam como potencialmente perigoso para a viabilidade celular. Desta forma, os siRNA, bem como potenciais complexos onde eles sejam transportados são facilmente identificados como material estranho e, como tal, são rapidamente fagocitados (Whitehead et al., 2009).

A rápida eliminação dos siRNAs pelos rins (por exemplo) é determinante para uma baixa eficiência no silenciamento da expressão génica. Desta forma, ao atingirem os rins, os siRNAs são filtrados e excretados, sendo assim eliminados do organismo sem exercerem a sua função nas células ou tecidos alvo (Gaynor et al., 2010; Whitehead et al., 2009). Neste contexto, estudos realizados em ratinhos verificaram que, após a injeção de siRNA não modificados, são necessários apenas 5 minutos para se observar acumulação destas moléculas nos rins e na urina (van de Water et al., 2006).

1.5.2 *Uptake* celular

Atualmente, um dos grandes desafios para a ciência e para os investigadores em terapia génica prende-se com a utilização de siRNAs ou complexos com siRNA que consigam difundir-se através da membrana celular. A membrana celular é uma densa rede de polissacáridos e proteínas fibrosas que por si só conferem resistência à passagem das moléculas de RNA para o citoplasma. Assim, os siRNAs são incapazes de atravessar espontaneamente a membrana das células alvo pelo que permanecem na corrente sistémica até serem degradados ou eliminados.

Vários grupos de investigação têm tentado desenvolver novas estratégias para aumentar a capacidade dos siRNAs serem incorporados pelas células, evitando no entanto que a internalização seja feita através da via endocítica. A entrada dos siRNAs na via endocítica é acompanhada pela acidificação do lúmen vesicular o que causa a degradação destes oligonucleótidos. Por este motivo, e para não comprometer a ativação da via de RNAi, ao entrarem para o meio intracelular, os siRNAs têm de ser libertados diretamente para o citosol ou podem ser modificados para que consigam, por exemplo, induzir a lise ou disrupção da membrana do endossoma (Tokatlian e Segura, 2010; Whitehead et al., 2009).

1.5.3 Silenciamento não específico

Uma das etapas cruciais na utilização da via de RNAi para fins terapêuticos é talvez o reconhecimento específico e a ligação de siRNAs ao mRNA desejado de modo a obter o seu silenciamento (Tokatlian e Segura, 2010).

O silenciamento não específico de genes ocorre, essencialmente, devido à baixa complementaridade entre a sequência de nucleótidos dos siRNAs e de mRNAs de genes que não deveriam ser silenciados (Tschuch et al., 2008). Vários estudos têm reportado a capacidade de silenciamento de genes pelos siRNAs, mesmo quando a complementaridade entre estes e o mRNA alvo é apenas parcial. De facto, Jackson e os seus colegas verificaram que para haver silenciamento de um transcrito, o emparelhamento entre este e o siRNA teria de compreender apenas 11-15 nucleótidos contíguos (Jackson et al., 2003). A confirmar este estudo, Snove e os seus colegas analisaram 359 sequências publicadas de siRNAs, tendo observado que 75% delas poderiam induzir o silenciamento de genes, para além do gene de interesse (Snove e Holen, 2004).

1.5.4 Toxicidade

A toxicidade promovida quer pelos siRNAs, quer pelos produtos resultantes da sua degradação é também um fator importante a ter em conta quando se considera a utilização destas moléculas em terapia génica. Assim, administrando altas doses de siRNAs quer ao nível celular, quer ao nível sistémico, pode-se gerar uma situação de saturação ao nível da maquinaria do RNAi. Deste modo, os sistemas biológicos são incapazes de processar todos os siRNA de forma a induzir o

silenciamento génico o que leva à acumulação destas moléculas no sistema, afetando assim o normal funcionamento das vias que regulam o metabolismo celular (Stevenson, 2004; Uprichard, 2005).

Por outro lado, o processamento de siRNAs (ou como um mecanismo de defesa imunitária ou como um processo necessário à incorporação destas moléculas na via de interferência) gera muitas vezes produtos secundários que não são tolerados pelos sistemas biológicos, o que pode interferir no normal funcionamento da célula (Davidson e McCray, 2011).

A via do interferão está envolvida na primeira linha de defesa antiviral, sendo ativada na presença de moléculas de dsRNA, normalmente uma molécula intermediária da replicação viral (Sledz et al., 2003). Este mecanismo consiste na síntese de proteínas, que por sua vez levam à expressão de um vasto conjunto de genes essenciais na resposta imunitária antiviral (Perry et al., 2004). Contudo, a ativação da via do interferão pode produzir efeitos citotóxicos através do silenciamento não específico de genes o que, em última instância, pode levar à morte celular (Gaynor et al., 2010; Uprichard, 2005).

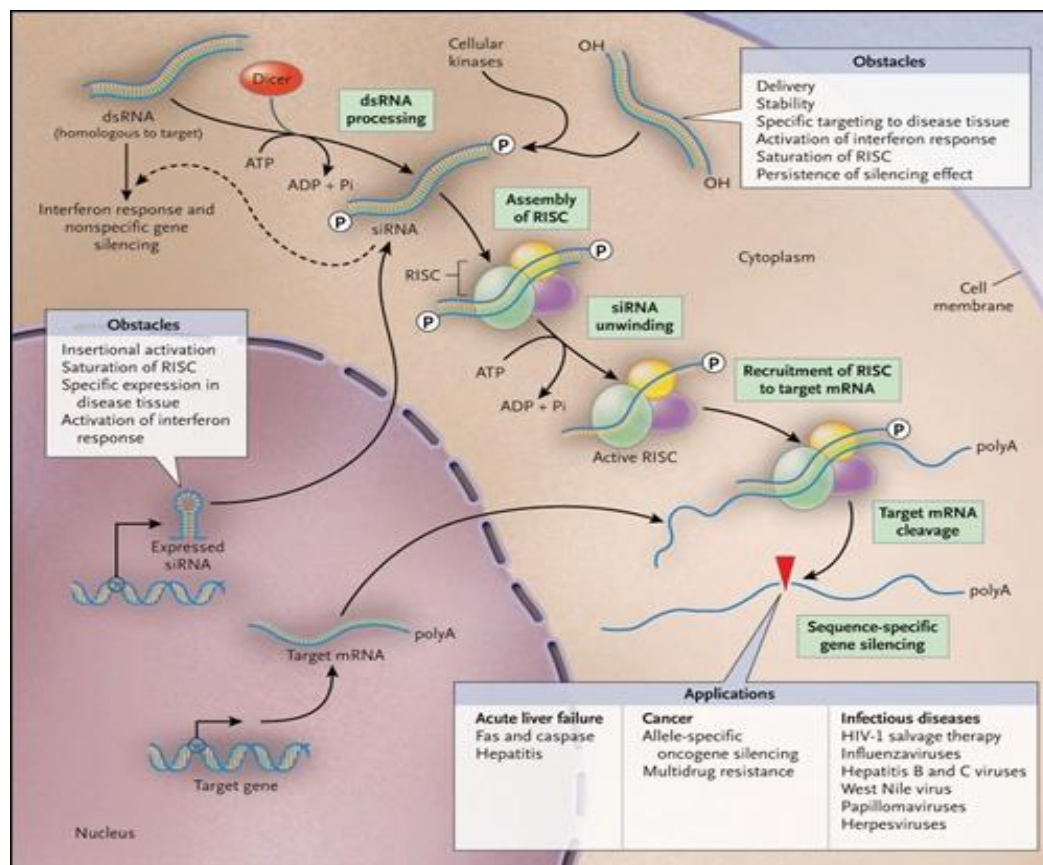


Figura 1.3 Principais obstáculos e aplicações dos siRNAs

A compreensão do mecanismo de RNAi e do papel que os siRNA assumem neste processo tem vindo a mostrar que estas últimas moléculas poderão a curto prazo ser utilizadas na terapia de várias doenças humanas como o cancro, insuficiência renal crónica ou doenças virais. No entanto, estudos *in vivo* têm demonstrado alguns obstáculos que limitam o uso de siRNAs na prática clínica. (Adaptado de Stevenson, 2004)

1.6 Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LI) são sais, compostos por um anião e por um catião, que se caracterizam por ter uma temperatura de fusão inferior a 100°C. (Petkovic et al., 2011). Tendo em conta o vasto número de iões positivos e negativos disponíveis para a síntese de LI, o elevado número de possíveis combinações que se consegue alcançar representa uma grande vantagem no desenho de LI com as propriedades desejadas para uma dada aplicação (Stoimenovski et al., 2010).

A atualmente denominada terceira geração de LI caracteriza-se pela utilização de elementos biocompatíveis, com atividade biológica e baixa toxicidade. De facto, devido à baixa toxicidade dos LI, estes têm sido reconhecidos como solventes da “química verde”, representando um reduzido impacto quer ao nível ambiental, quer ao nível da saúde (Laus et al., 2005; Petkovic et al., 2011).

As propriedades físicas, químicas e biológicas dos LI estão longe de ser totalmente compreendidas pela comunidade científica. Assim, vários estudos têm sido feitos no âmbito de um melhor conhecimento destes solventes, bem como das suas potenciais aplicações. A pesquisa de LI diferentes, com propriedades únicas e vantajosas para novas aplicações verificou um crescimento exponencial nas duas últimas décadas, sendo agora objeto de estudo em variadas áreas como a química ou a engenharia e mais recentemente as ciências biológicas e farmacêuticas (Ferraz et al., 2011; Laus et al., 2005; Petkovic et al., 2011).

Na área da química, Vidinha e os seus colaboradores (2008) utilizaram os LI para criar um material altamente estável e condutor. Assim, os LI interagem fortemente com uma rede polimérica de gelatina, gerando uma estrutura condutora que pode ser utilizada em baterias ou células fotovoltaicas (Vidinha et al., 2008). Por outro lado, na área da indústria farmacêutica, mostrou-se que ingredientes farmacêuticos ativos poderiam ser convertidos em LI e deste modo melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos neles baseados (Stoimenovski et al., 2010).

Num estudo que provou a notável versatilidade dos LI, Nishimura e os seus colegas (2002) demonstraram ser possível modificar com sucesso moléculas de adenina e de citosina (Nishimura and Ohno, 2002). Mais recentemente, Vijayaraghavan e seus colegas (2010) demonstraram que, quando hidratadas com líquidos iônicos por ele testados, as moléculas de DNA são extraordinariamente estáveis a longo-prazo (Vijayaraghavan et al., 2010). Estes estudos mostram novos horizontes para a modificação iónica de moléculas com reconhecido papel biológico, nomeadamente moléculas de DNA e RNA.

Neste sentido, sintetizaram-se siRNAs a partir de sequências de RNA que durante a transcrição incorporaram adenosinas ionicamente modificadas com uma molécula de polietilenoglicol (PEG). O ATP (Adenosina trifosfato) foi escolhido como catião uma vez que é uma molécula envolvida na expressão génica, participando ativamente no processo de transcrição. Além disso, é uma molécula associada à transferência de energia em mecanismos intracelulares (Knowles, 1980), o que favorece estudos de cinética enzimática e/ou atividade biológica.

Por outro lado, procurou-se que o anião escolhido fosse biocompatível e que tivesse força suficiente para não se dissociar do nucleótido durante o processo de transcrição e digestão dos dsRNAs. Estudos anteriores, efetuados por elementos do grupo de investigação em que estive inserida, indicaram que o PEG é capaz de modificar moléculas de ATP (Figura 1.4), sem no entanto afetar a sua integridade. Com isto quer-se dizer que os resultados obtidos parecem ser indicadores de que a ligação iónica entre o nucleótido e o PEG se mantém após a síntese das cadeias de siRNA, sem afetar a sua conformação e consequentemente o seu reconhecimento por parte de enzimas (Resultados não publicados).

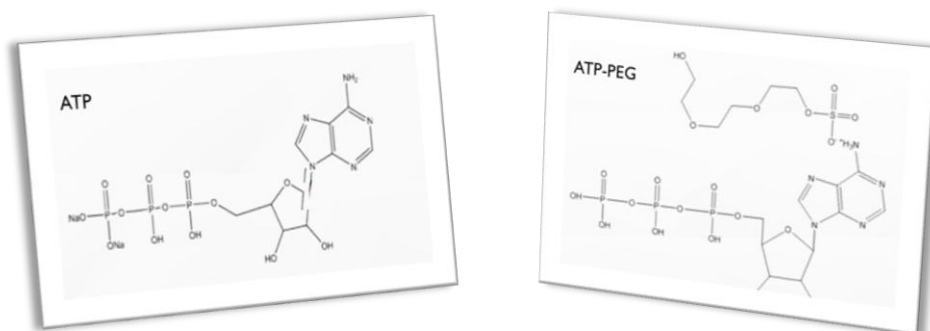


Figura 1.4 Estrutura química da molécula de ATP e de ATP ionicamente modificado (ATP-PEG)

Vários são os estudos que reportam a modificação de siRNAs ou dos seus vetores de entrega através da sua conjugação com moléculas de PEG. Esta modificação permite a evasão das moléculas de siRNA ao sistema imunitário, constituindo uma alternativa inerte e biocompatível devido à estabilidade química e à estrutura simples apresentadas pelo PEG (Sanz et al., 2012; Whitehead et al., 2009).

1.7 Objetivos do trabalho

O trabalho descrito nesta dissertação insere-se no âmbito do desenvolvimento de novas estratégias para o aumento da estabilidade de siRNAs recorrendo à utilização de nucleótidos ionicamente modificados para sintetizar siRNAs mais estáveis.

O objectivo deste trabalho baseia-se assim na síntese *in vitro* de siRNAs ionicamente modificados e na avaliação da eficiência do silenciamento induzido por estas moléculas na expressão da proteína eGFP em células MCF-7 quando comparado ao silenciamento induzido por siRNAs comerciais e siRNAs não modificados. Pretende-se igualmente avaliar a influência desta modificação na estabilidade desse silenciamento.

2 Materiais e Métodos

2.1 Extração e purificação de DNA plasmídico

O plasmídeo *pcDNA3-eGFP* (Anexo 1, plasmid 13031, Addgene, Massachusetts, EUA) foi extraído e purificado a partir de uma cultura de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α . Para isso, inocularam-se várias colónias de *E. coli* em 30 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido (Applichem, Darmstadt, Alemanha), suplementado com 30 μ L de ampicilina (100 μ g/mL) (Bioline, Londres, Reino Unido). A cultura bacteriana cresceu durante a noite, a 37°C numa incubadora com agitação orbital (Brunswick Scientific, EUA).

O DNA plasmídico (pDNA) foi extraído utilizando o kit *NZYMiniprep* (NZYTech, Lisboa, Portugal), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O pDNA isolado foi quantificado no espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA.) de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$Abs = \epsilon \cdot b \cdot c. \quad (1)$$

em que *Abs* corresponde à absorvância, ϵ ao coeficiente de extinção molar ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), *b* ao percurso ótico (cm) e *c* à concentração da espécie ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

A pureza do pDNA isolado foi também determinada neste equipamento através da análise das razões entre a absorvância a 260 nm (*Abs*₂₆₀) e a absorvância a 280 nm (*Abs*₂₈₀), bem como entre *A*₂₆₀ e a absorvância a 230 nm (*Abs*₂₃₀). O pico de absorvância máximo dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) é de 260 nm, enquanto o pico de absorvância máxima de proteínas é de 280 nm e o de contaminantes tais como sais e compostos orgânicos é de 230 nm. Analisando a razão entre estas absorvâncias, pode inferir-se a contaminação dos ácidos nucleicos com proteínas (*Abs*₂₆₀/*Abs*₂₈₀ inferior a 1,8) e com outros compostos (*Abs*₂₆₀/*Abs*₂₃₀ inferior 1,8).

De forma a confirmar se o pDNA extraído corresponde ao pretendido, procedeu-se à sua linearização por digestão com a endonuclease EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, EUA). Assim, o pDNA extraído foi digerido com a enzima de restrição EcoRI durante 2,5 h a 37°C, tendo sido analisado através de eletroforese unidimensional em gel de agarose (Bioline, Citomed, Portugal) 0,8% (m/v). A enzima EcoRI corta o *pcDNA3-eGFP* num único local (Anexo 1), esperando-se por isso obter um fragmento de DNA na forma linear com cerca de 6160 pb. O gel foi preparado diluindo a agarose em TAE (1X) e adicionando 2 μ L de *GelRed* (Biotium, California, EUA) (concentração inicial 10000x) por cada 100 mL de gel.

2.2 Desenho de *primers* para a amplificação do gene *eGFP* por PCR

Recorrendo à ferramenta bioinformática “*primer 3*” (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), foram desenhados 2 pares de *primers* (Tabela 2.1), denominados GFP1 e GFP2 para amplificação do gene que codifica a eGFP. Todos os *primers* foram desenhados de forma a emparelhar com a região codificante do gene, para posteriormente serem utilizados em reações de transcriptase reversa PCR (RT-PCR, do inglês *Reverse Transcriptase PCR*). A especificidade dos *primers* com a região alvo foi analisada recorrendo à ferramenta bioinformática “*Primer-Blast*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), tendo-se amplificado fragmentos de 417 pb e 560 pb para GFP1 e GFP2, respetivamente.

Tabela 2.1 Sequência dos *primers* utilizados para amplificar o gene que codifica para a eGFP (Anexo 2)

Nome atribuído ao <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i>
eGFP1 Forward	5' TTACTCGAGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
eGFP1 Reverse	5' TTACTCGAGGGGGTGTCTGCTGGTAGTG 3'
eGFP2 Forward	5' TTACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'
eGFP2 Reverse	5' TTACTCGAGGCCCCAGGATGTTGCCGTCC 3'

De forma a verificar qual dos dois pares de *primers* seria o mais indicado para amplificar o gene de interesse procedeu-se à técnica de PCR. Assim, preparou-se num microtubo uma mistura reacional contendo 1 µL de pDNA extraído em 2.1., tampão Hi Specific (0,5X), 1 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgSO₄, 8 pM de *primers* GFP1 ou GFP2, tampão de reação (1X), DMSO (5,6 %), 2,5 U/µL TaqMed DNA polimerase (Bioline) e água destilada até perfazer o volume total de 15 µL.

As condições utilizadas na reação de amplificação do gene *eGFP* estão descritas na Tabela 2.2

Tabela 2.2 Programa de PCR utilizado para amplificar o gene que codifica para a eGFP

	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	3 min	1
Desnaturação	95	45 seg	30
<i>Annealing</i>	57	40 seg	30
Extensão	72	1,5 min	30
Extensão final	72	10 min	1

O DNA amplificado foi visualizado através de eletroforese unidimensional em gel de agarose (Bioline) 0,8% (m/v) tal como descrito na secção 2.1.

2.3 Síntese de siRNAs

2.3.1 Amplificação do DNA molde para transcrição *in vitro*

Tendo em conta os objetivos deste trabalho, procedeu-se à síntese de siRNAs. Para isso, foi necessário preparar previamente um DNA molde, a partir do qual se sintetizou uma molécula longa de dsRNA que foi digerida de forma a obter os siRNAs. Assim, numa primeira fase amplificou-se o gene de interesse *eGFP* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) num termociclador *MyCycler Thermal Cycler* (BioRad, Califórnia, EUA). Neste sentido preparou-se uma mistura reacional contendo 0,5 µL do pDNA extraído em 2.1 (com concentração de 5,5 ng/µL), 4 mM de dNTPs (Bioline), 2 µM de *primer forward* (Tabela 2.3), 2 µM de *primer reverse* (Tabela 2.3), 2 mM de MgCl₂, tampão de reação (1X), 2,5 U/ µL de NZYtaq DNA polimerase (NZYTech) e água MiliQ (MQ H₂O) até perfazer o volume total de 50 µL.

Tabela 2.3 Sequência dos *primers* usados na reação de PCR. A sequência do promotor T7 encontra-se sublinhada.

Nome do <i>primer</i>	Sequência
T7 eGFP Forward	5' CGTAATACGA <u>CTCACTATAG</u> GCCCATCCTG G 3'
T7 eGFP Reverse	5' CGTAATACGA <u>CTCACTATAG</u> GAGCAGCACG G 3'

As condições utilizadas na reação de amplificação do gene *eGFP* estão descritas na Tabela 2.4

Tabela 2.4 Programa de PCR utilizado para amplificar o gene *eGFP* que funcionará como DNA molde na reação de transcrição *in vitro*

	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	3	1
Desnaturação	95	0,5	30
<i>Annealing</i>	55	0,5	30
Extensão	72	1	30
Extensão final	72	10	1

Após a amplificação do gene que codifica para a eGFP, os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese unidimensional em gel de agarose (Bioline) 1% (m/v) tal como descrito no ponto 1 da secção 2.

Seguidamente a banda de DNA correspondente aos 590 pb foi extraída e purificada utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Uma vez que este DNA foi utilizado como molde da T7 RNA polimerase, e dada a extrema sensibilidade desta enzima à inibição por sais,

procedeu-se a um passo adicional de purificação. Desta forma, o DNA foi dialisado, tendo-se depois avaliado a sua quantidade e qualidade no espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

2.3.2 Síntese de dsRNAs

2.3.2.1 Transcrição *in vitro* de dsRNAs

O início da transcrição é determinado pelo reconhecimento e ligação da RNA polimerase a uma sequência específica do DNA que se designa promotor. Por esta razão, e uma vez que o gene *eGFP* não incluía promotores que pudessem ser reconhecidos pela polimerase, os *primers* utilizados na amplificação deste gene foram desenhados de forma a incluírem uma sequência de nucleótidos correspondente à sequência do promotor T7 (Tabela 2.3). Desta forma, a RNA polimerase do fago T7 reconhece as bases da sequência do promotor presentes no DNA amplificado e liga-se às mesmas, iniciando-se assim a transcrição.

Para a síntese *in vitro* de dsRNA, preparou-se num microtubo de 1,5 mL uma mistura de reação contendo tampão T7 RNA polimerase (1X), 50 U/ml de T7 RNA polimerase (New England Biolabs, Ipswich, EUA), 0,25 mM de NTPs, 1 µg de DNA molde (obtido em 2.1) e água tratada com DEPC (H₂O – DEPC) de forma a perfazer o volume total de 50 µl. Neste trabalho foram utilizados NTPs (ATP, CTP, UTP, GTP) comerciais (Bioline) e um NTP modificado (ATP-PEG), sintetizado quimicamente por Diana Garcia do Laboratório de Biocatálise e Bioenergia do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade Nova de Lisboa. A mistura de reação foi incubada a 37°C durante 2 horas. Depois, adicionaram-se 6 µl de tampão de reação DNase I (Fermentas, Maryland, EUA) e 4 µl de DNase I RNase free (Fermentas), tendo-se incubado a mistura durante 30 minutos a 37°C. Por fim, adicionou-se 0,04 mM de EDTA (Izasa, representante da New England Biolabs em Portugal) para parar a reação.

2.3.2.2 Precipitação e purificação de dsRNAs

Adicionou-se tampão TE à mistura de reação obtida na secção 2.3.2.1. de forma a perfazer o volume total de 200 µl e 200 µl de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Seguidamente agitou-se a mistura no vórtex e centrifugou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos e a 13000 rpm. Após a centrifugação, recuperou-se a fase aquosa para um novo microtubo e determinou-se o seu volume. Adicionaram-se 2 volumes de etanol absoluto e colocaram-se os microtubos a -20°C durante 2 horas. Centrifugaram-se as amostras de dsRNA durante 30 minutos, a 4°C e a 13000 rpm. Descartaram-se os sobrenadantes, adicionou-se 1 mL de etanol a 70 % (v/v) e centrifugaram-se as amostras durante 10 min, a 4°C e 13000 rpm. Descartaram-se os sobrenadantes e deixaram-se os sedimentos secar à temperatura ambiente. Por fim, ressuspenderam-se os sedimentos em 20 µl H₂O – DEPC.

O dsRNA foi quantificado no espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), como descrito na secção 2.1. Determinou-se igualmente a pureza do RNA sintetizado, que é considerado puro quando as razões Abs_{260}/Abs_{280} e Abs_{260}/Abs_{230} apresentam valores de aproximadamente 2,0.

A integridade do dsRNA foi ainda avaliada através de eletroforese em gel de agarose (Bioline) 1% (m/v) e tampão TBE 1X. O gel foi depois corado à temperatura ambiente numa solução de SyBr®Green II RNA (1:10000) (Invitrogen, Nova Iorque, EUA) durante 40 minutos, com agitação.

2.3.2.3 Síntese *in vitro* de siRNA

Para a síntese *in vitro* de siRNA, adicionou-se num microtubo de 1,5 mL, tampão de reação RNase III (1X), 0,05 mM de $MnCl_2$, 10 U/mL de RNase III (New England Biolabs), 5 µg de dsRNA molde (sintetizado em 2.3.2.2) e H_2O – DEPC de modo a perfazer o volume total de 50 µl. Agitou-se a mistura de reação e incubou-se a 37°C durante 45 minutos. Por fim, adicionaram-se 0,04 mM de EDTA.

2.3.2.4 Purificação dos siRNA

Com o intuito de remover componentes indesejados (como sais por exemplo) provenientes da digestão com a RNase III, procedeu-se à purificação dos siRNA adicionando para isso 2 volumes de etanol absoluto e 2 µl de glicogénio RNase-free (New England Biolabs). Colocou-se a mistura a -20°C durante 2h 30 min, tempo após o qual a mistura foi centrifugada durante 30 minutos, a 4°C, 14000 rpm. Removeu-se o sobrenadante, adicionaram-se 2 volumes de etanol (70%) e centrifugou-se durante 10 minutos a 4°C, 14000 rpm. Repetiu-se o procedimento mais 2 vezes e deixou-se o sedimento a secar à temperatura ambiente. Por fim, suspendeu-se o siRNA em 15 µl de H_2O -DEPC.

A concentração dos siRNA foi determinada (com base na equação 1 atrás descrita) no espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), através do qual também se determinou o grau de pureza do oligonucleótido sintetizado.

A integridade dos siRNA foi ainda avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (BioRad) 20% (m/v). O gel foi depois corado à temperatura ambiente numa solução de SyBr®Green II RNA (1:10000) (Invitrogen) durante 40 minutos, com agitação.

2.4 Manutenção da linha celular em estudo (MCF-7)

Neste estudo, foi utilizada a linha celular MCF-7/eGFP (linha celular do cancro da mama que expressa eGFP) isolada pela primeira vez em 1970 a partir de uma efusão pleural retirada de uma mulher caucasiana de 69 anos com carcinoma metastático de mama (Soule et al., 1973).

Esta linha, constituída por células aderentes, foi adquirida à Cell Biolabs (Califórnia, EUA) e foi mantida em meio completo constituído por DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% (v/v) de FBS (Invitrogen) e 1% (v/v) penicilina/streptomicina (Invitrogen). As células foram incubadas em

frascos de tampa ventilada BD Falcon de 75 mL (BD Biosciences, New Jersey, EUA), numa estufa Leec (Nottingham, Reino Unido) a 37 °C, numa atmosfera humidificada com 5% (v/v) CO₂.

A passagem das células foi efetuada sempre que se verificava uma elevada densidade celular (entre 70 a 90%). Para isso, aspirou-se o volume total do meio de cultura e, dado que as células MCF-7 são aderentes, adicionaram-se 5 mL de tripsina (Invitrogen) para que estas perdessem a aderência ao frasco de cultura. Incubou-se a cultura a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5% (v/v) CO₂ durante 10 minutos. Após este tempo, adicionou-se 5 mL de meio completo para neutralizar a tripsina e de seguida aspirou-se todo o conteúdo do frasco de cultura para um tubo de centrifuga de 50 mL. Seguidamente centrifugou-se a cultura durante 5 minutos, a 25°C e a 1500 rpm, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 2 mL de meio completo. Por fim, adicionaram-se a um novo frasco de cultura 15 mL de meio completo e 50 µL da suspensão celular preparada. A existência de um número suficiente de células e a inexistência de aglomerados celulares foi confirmada num microscópio invertido Olympus SC20 (Olympus, Tóquio, Japão) e as células foram novamente incubadas a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5% (v/v) CO₂.

2.5 Determinação da concentração celular

Para a realização de ensaios de transfeção e viabilidade celular, foi utilizada uma densidade celular de 1x10⁵ células/mL. Para a contagem celular, adicionaram-se num microtubo de 1,5 mL, 350 µL de meio completo, 50 µL de uma suspensão celular preparada como descrito na secção anterior e 100 µL de azul *Trypan* 0,1 % (m/v) (Sigma, Missouri, EUA). O azul *trypan* é um corante de exclusão, uma vez que apenas é capaz de penetrar em células cujas membranas plasmáticas não estejam intactas (células inviáveis). Assim, quando observadas ao microscópio, as células viáveis não apresentam qualquer coloração, ao contrário das células inviáveis, que apresentam coloração azul.

Em seguida, um pequeno volume da solução preparada foi colocado sobre as câmaras de contagem de um hemocítmetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha). Colocou-se o hemocítmetro num microscópio Olympus SC20 (Olympus), contaram-se as células viáveis e determinou-se a concentração celular a partir da fórmula (2), em que *fd* corresponde ao fator de diluição utilizado.

$$\frac{N^{\circ} \text{ de células}}{\text{mL}} = \frac{\sum \frac{N^{\circ} \text{ células nos 4 quadrantes}}{\text{da câmara de contagem}}}{4} \times 10^4 (\text{volume da câmara em mm}^3) \times fd \quad (2)$$

Sabendo a concentração de células viáveis, calculou-se o volume de suspensão celular necessário para preparar um solução com 1x10⁵ células/mL e, dependendo do ensaio em causa distribuíram-se 2500 µL, 500 µL ou 100 µL desta solução pelos vários poços de placas de 6, 24 e 96 poços respetivamente (TPP, Trasadingen, Suíça).

2.6 Transfecção de siRNAs

A transfecção foi realizada utilizando *Lipofectamine*[®]*RNAiMAX* (Invitrogen) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As células transfectadas foram depois utilizadas para realizar vários ensaios, nomeadamente de quantificação de expressão de eGFP, viabilidade celular e RT-PCR. Por este motivo, e tendo em conta os equipamentos disponíveis para efetuar cada tipo de ensaio posterior, a transfecção foi realizada em placas de 6, 24 e 96 poços.

Para averiguar a citotoxicidade do agente de transfecção (*Lipofectamine*[®]*RNAiMAX*), realizou-se um primeiro estudo em que as células foram incubadas com diferentes concentrações deste composto (ver secção 2.7). Como controlo positivo de transfecção utilizou-se um siRNA comercial 5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUC 3' (Dharmacon-Thermo Scientific, Spain) desenhado especificamente contra a eGFP (Tschuch et al., 2008). Por último foram testados os siRNA sintetizados por transcrição *in vitro* (secção 2.3). Segundo a literatura, a razão entre siRNA e *Lipofectamine*[®]*RNAiMAX* pode ser determinante para uma melhor eficiência na transfecção de siRNAs. Por este motivo, a transfecção foi feita com diferentes concentrações de siRNA (5 nM, 10 nM, 20 nM e 35 nM) e diferentes quantidades de *Lipofectamine*[®]*RNAiMAX* (0,8 µL, 1 µL e 1,5 µL para as placas de 24 poços). Estes volumes foram tomados como referência para o cálculo de volumes a usar nos ensaios efetuados com placas de 6 e 96 poços.

Durante a otimização desta técnica, as células transfectadas foram observadas em campo claro e em fluorescência num microscópio BX51 (Olympus), acoplado a uma máquina DP50 (Olympus) e com uma unidade de fluorescência U-RFL-T (Olympus). Foi utilizado o filtro U-MWB2 (Olympus), tendo-se recorrido ao *software* AnalySIS[®] *soft imaging system* (Olympus) para fotografar as MCF-7/eGFP.

2.7 Estudos de viabilidade celular

2.7.1 MTS/ PMS

No sentido de averiguar a citotoxicidade da *Lipofectamine*[®]*RNAiMAX*, bem como a viabilidade celular após a transfecção com os siRNA (comercial e sintetizados na secção 2.3), foi realizado um ensaio colorimétrico com MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Este composto, quando exposto a PMS (metossulfato de fenazina (do inglês *phenazine methosulfate*)) é convertido pelas células viáveis em formazano. Assim, este método colorimétrico é frequentemente utilizado para determinar o número de células viáveis em ensaios de proliferação ou quimiotoxicidade (Promega, 2009).

A transfecção foi feita em placas de 96 poços como descrito na secção 2.6. Quarenta e oito horas após a transfecção, aspirou-se o meio presente em cada poço e, de acordo com o kit *CellTiter 96*[®] *Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, Wisconsin, EUA), adicionou-se a cada

poço 100 µL de uma solução contendo meio completo, MTS e PMS na proporção 100: 20: 1. Incubou-se a placa durante 40 minutos a 37°C e leu-se a absorvância a 490 nm (Abs_{490}) num leitor de placas *Reader Mod. 680* (BioRad). De seguida determinou-se a percentagem de células viáveis utilizando a fórmula (3):

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{Abs_{490} (amostra)}{Abs_{490} (controle)} \times 100 \quad (3)$$

2.8 Quantificação dos níveis de expressão da eGFP

2.8.1 Fluorimetria

Passadas 48h após a transfeção dos siRNAs, a expressão da eGFP foi quantificada por espectrofluorimetria. Nesse sentido, o meio presente nos poços onde as células foram transfectadas foi aspirado e as células foram lavadas 3 vezes com 600 µL de tampão fosfato salino (PBS) 1X. Seguidamente adicionaram-se a cada poço 100 µL de água e colocaram-se as placas num agitador durante cerca de meia hora de forma a proceder à lise celular por choque osmótico. Apesar de serem conhecidos tampões de lise bastante eficientes, escolheu-se a água de forma a evitar possíveis interferências nas medições no espectrofluorímetro. Após a agitação vigorosa das células, esta solução foi transferida para microtubos de 1,5 mL e centrifugou-se a solução durante 25 minutos a 4°C, 13000 rpm. De seguida, retirou-se 60 µL do sobrenadante para uma cuvete de quartzo 105.251-QS (Hellma, Müllheim, Alemanha) e quantificou-se a fluorescência emitida pela eGFP nas diferentes condições testadas. As amostras foram analisadas num espectrofluorímetro *Cary Eclipse* (Varian, Califórnia, EUA) tendo-se definido *slits* de 5 nm. A determinação da fluorescência emitida pela eGFP das células foi feita num intervalo 490 – 650 nm, após excitação da proteína a 480 nm.

2.8.2 Quantificação dos níveis de proteína total nas amostras

A quantificação dos níveis de proteína total nas amostras foi determinada pelo método de Bradford, tendo sido utilizada a BSA (albumina de soro bovino, do inglês *Bovine Serum Albumine*)) (Thermo Scientific) como padrão. O método de Bradford é um método colorimétrico que se baseia na interação entre o corante azul de Coomassie brilhante presente no Reagente de Bradford (Thermo Scientific) e as proteínas presentes na amostra. Assim, quando este corante forma complexos com as proteínas, a sua absorvância altera de 465 nm para 595 nm, o que se traduz numa mudança de cor da solução, que passa de castanho para azul (Thermo Scientific, 2011).

Preparou-se uma série de diluições sucessivas a partir de uma solução de BSA cuja concentração era conhecida (2 mg/mL). Utilizando um leitor de placas *Infinite M200* (Tecan, Männedorf, Suíça), mediu-se a absorvância a 595 nm das várias soluções de concentração conhecida

(entre 500 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e obteve-se uma reta padrão que foi posteriormente utilizada para calcular a quantidade de proteína total presente nos lisados. Seguidamente misturaram-se numa microplaca de 96 poços (TPP), 5 μL de cada lisado preparado anteriormente (na secção 2.8.1) com 250 μL de Reagente de Bradford em cada poço. A absorvância das amostras foi medida num leitor de placas *Infinite M200* (Tecan) a 595 nm.

Determinada a equação da reta padrão e a absorvância dos lisados, calculou-se a quantidade de proteína total presente em cada amostra, tornando possível normalizar os valores da fluorescência emitida pela eGFP (em 2.8.1). Caso esta normalização não fosse efetuada, os valores obtidos na determinação da emissão de fluorescência poderiam não ser comparáveis e/ou correlacionáveis devido a variações na quantidade de proteína total nas amostras.

2.9 Reação de transcriptase reversa seguida de PCR

2.9.1 Extração do RNA total de células MCF-7

Com o intuito de providenciar RNA molde para a reação de RT-PCR, procedeu-se à extração de RNA total a partir das células MCF-7 incubadas com *Lipofectamine[®]RNAiMAX*.

A incubação foi efetuada em frascos de cultura de 25 cm^2 (BD Biosciences) 48 h antes de realizar a extração de RNA. Após este período, aspirou-se o volume total do meio do frasco de cultura e adicionaram-se 2 mL de tripsina (Invitrogen). Incubou-se a cultura a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 5% (v/v) CO_2 durante 10 minutos e de seguida adicionaram-se 5 mL de meio completo. Aspirou-se todo o conteúdo do frasco de cultura para um tubo de centrifuga de 50 mL e centrifugou-se durante 5 minutos, a 25°C e a 1500 rpm. Depois, aspirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 2 mL de PBS 1X. Centrifugou-se a cultura durante 5 minutos, a 25°C e a 1500 rpm, descartou-se o sobrenadante e extraiu-se o RNA total das células utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

A quantidade e pureza do RNA obtido foram avaliadas no espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), como descrito na secção 1.

2.9.2 Síntese de cDNA e PCR

No sentido de avaliar os níveis de mRNA *eGFP* nas células controlo (não sujeitas a transfeção), procedeu-se a uma reação de transcrição reversa seguida de PCR. Assim, a partir do RNA extraído no secção 2.9.1, procedeu-se à síntese de cDNA utilizando o kit *cDNA Synthesis Kit* (Bioline), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Esta reação é um método sensível que pressupõe a utilização de uma enzima transcriptase reversa para a síntese de uma cadeia de DNA complementar ao RNA molde. A cadeia de DNA resultante é denominada cDNA e é subsequentemente amplificada por PCR.

As condições e programa utilizados para amplificar o cDNA estão descritos na secção 2.2. Utilizou-se como controlo interno da reacção de RT-PCR o gene *ACTB*, que codifica para a β -actina. Assim, num microtubo de 200 μ L preparou-se uma mistura reacional igual à descrita na secção 2.2, mas contendo *primers* específicos (Tabela 2.5) para amplificar o gene *ACTB* (amplicão com 270 pb).

Tabela 2.5 Sequência dos primers utilizados para amplificar o gene *ACTB* que codifica para a β -actina

Nome atribuído ao <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i>
<i>ACTB Forward</i>	5' CTACAATGAGCTGCGTGTGGC 3'
<i>ACTB Reverse</i>	5' CAGGTCCAGACGCAGGATGGC 3'

Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese unidimensional em gel de agarose (Bioline) 2% (m/v). O gel foi preparado diluindo a agarose em TAE (1X) e adicionando 2 μ L de *GelRed* (Biotium, Califórnia, EUA) (concentração inicial 10.000x; 500 μ L) por cada 100 mL de gel.

O gel foi visualizado sob luz UV num transiluminador *UVIpure* (UVITEC, Cambridge, Reino Unido), e fotografado com uma câmara *Kodak AlphaDigiDoc* (Alpha Innotech, Califórnia, EUA), sendo a aquisição da imagem efetuada através do *software* *AlphaEaseFC* (Alpha Innotech).

3 Resultados e discussão

3.1 Extração e purificação de DNA plasmídico

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar *in vitro* a ação de siRNAs ionicamente modificados. Para isso, numa primeira fase, procedeu-se à extração e purificação de pDNA, o qual contém clonado um gene que codifica para a proteína eGFP. O pDNA extraído foi depois linearizado com a enzima EcoRI e analisado através de eletroforese unidimensional em gel de agarose (Figura 3.1) Esta análise permitiu observar de forma qualitativa se o plasmídeo extraído tinha o peso molecular pretendido, permitindo também inferir acerca da pureza da amostra quanto à possível contaminação com DNA genómico e RNA.

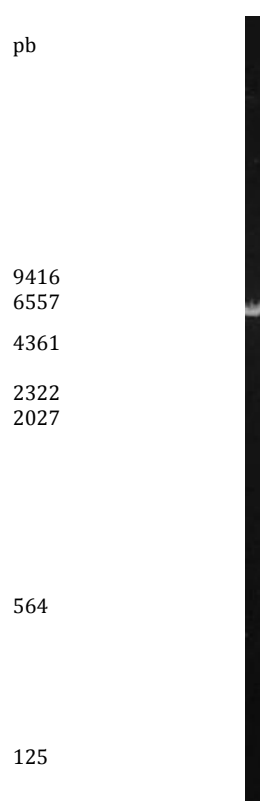


Figura 3.1 Perfil de DNA obtido por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) após a digestão do plasmídeo pcDNA3_eGFP com a enzima de restrição EcoRI.

M- marcador molecular λ HindIII, 1- *pcDNA3-eGFP* digerido com EcoRI

Na Figura 3.1 é possível observar uma banda única e bem definida, com cerca de 6160 pb, podendo-se assim concluir que o pDNA extraído corresponde efetivamente ao *pcDNA3-eGFP* que se pretendia obter. Além disso, a ausência de bandas inespecíficas no poço 1 indica que a amostra não está contaminada com outros ácidos nucleicos o que garante, à partida, que o sucesso de ensaios futuros não foi comprometido.

Após se ter confirmado que o pDNA extraído correspondia ao pretendido, este foi utilizado como molde para a amplificação do gene *eGFP*. Os dois pares de *primers* GFP1 e GFP2 foram

testados com o intuito de verificar qual seria mais indicado para utilizar depois em reações de RT-PCR.

O resultado das amplificações foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 3.2).

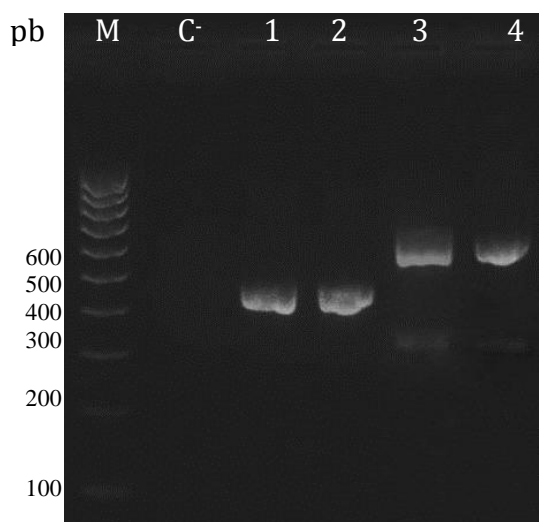


Figura 3.2 Perfil de DNA obtido por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) M- marcador molecular *Hyperladder IV*. C- Controle negativo; 1-eGFP amplificado a 56°C com par de *primers* GFP1 2- eGFP amplificado a 57°C com par de *primers* GFP1; 3- eGFP amplificado a 56°C com par de *primers* GFP2, 4- eGFP amplificado a 57°C com par de *primers* GFP2

No que diz respeito ao controle negativo (poço C⁻), era esperado que não apresentasse qualquer banda, uma vez que a reação de amplificação foi feita na ausência de DNA. Pode-se assim inferir que nenhum dos componentes utilizados nesta reação estava contaminado com DNA.

Como é possível observar relativamente à amplificação por PCR do gene *eGFP*, para as condições testadas, o par de *primers* GFP1 produziu, tal como esperado, uma única banda com cerca de 400 pb (poço 1 e 2, Figura 3.2). Quando analisamos os produtos de amplificação gerados pelo par de *primers* GFP2 (poço 3 e 4, Figura 3.2), verifica-se que, para além da banda pretendida (560 pb), também é possível ver uma banda inespecífica, mais tênue, de cerca de 300 pb. No poço 3 a reação de amplificação ocorreu com uma temperatura de 56°C. Assim, e uma vez que a temperatura a que ocorre o emparelhamento (*annealing*) entre os *primers* e a sequência alvo influencia a especificidade da amplificação, elevou-se a temperatura de *annealing* para 57°C para tentar eliminar esta banda. Como se pode observar, a subida da temperatura de *annealing* não foi suficiente para eliminar a banda. Assim, uma vez que com os *primers* GFP1 se obteve o produto de PCR com o tamanho esperado sem ocorrência de amplificação inespecífica, escolheu-se este par de *primers* para as reações de RT-PCR realizadas neste trabalho e uma temperatura de *annealing* de 57°C (Tabela 2.1).

3.2 Síntese de siRNA

Tendo em vista a caracterização de siRNA ionicamente modificados, procedeu-se numa primeira fase à transcrição *in vitro* do gene *eGFP* (Figura 3.3). Assim, o DNA molde foi primeiramente amplificado por PCR de modo a que o produto final contivesse em cada extremidade (3' e 5'), a sequência de nucleótidos correspondente ao promotor T7. Desta forma, a transcrição efetuada no passo seguinte dá-se nas duas direções, dando origem a duas cadeias de RNA (*sense* e *antisense*) que, sendo complementares, emparelham entre si dando origem a RNA em cadeia dupla (Yang et al., 2004).

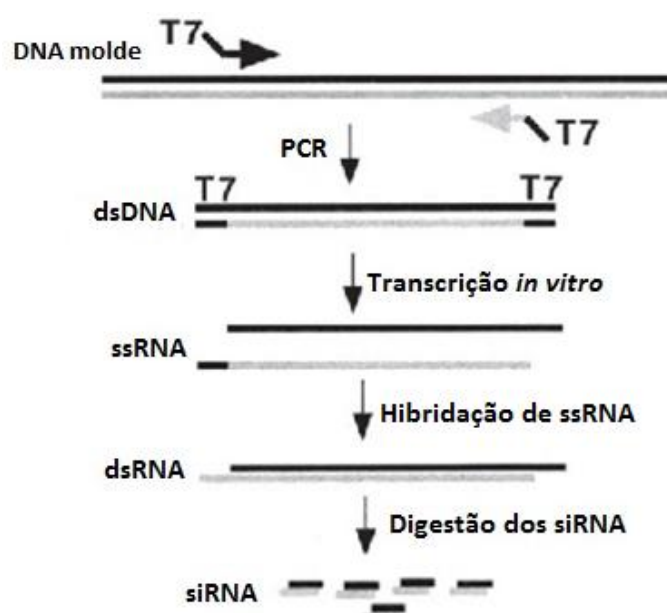


Figura 3.3 Representação esquemática do processo de síntese de siRNAs.

Uma sequência do promotor é adicionada à extremidade 5' de cada *primer* utilizado para a amplificação do DNA molde. Desta forma, o produto de PCR resultante possui em ambas as extremidades uma sequência que é reconhecida pela T7 RNA polimerase. Assim, inicia-se a transcrição do DNA, originando cadeias simples de RNA (ssRNA), *sense* e *antisense*. Sendo complementares entre si, as duas cadeias vão emparelhar originando assim cadeias duplas de RNA (dsRNA). Após a síntese de dsRNA, estes são digeridos com uma RNase III, obtendo-se assim fragmentos mais pequenos (siRNA) com cerca de 25 pb. (Adaptado de Yang et al., 2004)

Neste trabalho, sintetizaram-se cadeias duplas de RNA utilizando ATP comerciais e ATPs ionicamente modificados com PEG. Estes últimos foram sintetizados anteriormente por elementos do grupo de investigação onde estive inserida, tendo-se comprovado a modificação por estudos de NMR.

As moléculas de ATP (independentemente de serem modificadas ou não) são incorporadas na sequência de RNA durante a transcrição *in vitro*, dando assim origem a cadeias duplas de RNA (dsRNA) que foram analisadas por eletroforese unidimensional em gel de agarose (Figura 3.4). Como se pode observar, tanto no poço 1 como no poço 2 se obtém uma única banda, de elevada intensidade e com o tamanho previsto (aproximadamente 590 pb). Estes resultados indicam que, independentemente

da utilização de ATPs comerciais ou ionicamente modificados, a transcrição do DNA molde em RNA foi bem sucedida.

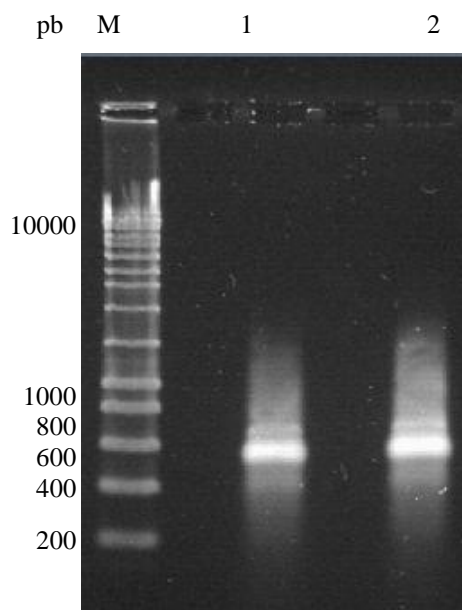


Figura 3.4 Análise electroforética dos dsRNA obtidos por transcrição *in vitro* em gel de agarose 1% (m/v). M- Marcador molecular NZYDNA Ladder III (NZYTECH); 1 – dsRNA; 2- dsRNA-PEG

Após a transcrição, bem-sucedida, de dsRNA, estes foram digeridos por uma RNase III de forma a obter pequenos fragmentos de RNA em cadeia dupla (siRNA), os quais foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 20% (m/v) a 110 V durante 3,5 h (Figura 3.5). A visualização de siRNAs em géis de poliacrilamida deveu-se essencialmente ao facto de estes apresentarem maior resolução relativamente aos géis de agarose (Rio et al., 2010). Nesta fase, e tendo em conta que os siRNA sintetizados a partir de nucleótidos modificados (siRNA_PEG) deveriam ter um maior peso molecular e eventualmente uma conformação diferente, esperava-se que apresentassem tamanhos diferentes dos siRNA sintetizados com ATP não modificados (siRNA_ATP). Assim, ao observar tamanhos diferentes entre os siRNA_PEG e os siRNA_ATP, ser-nos-ia possível provar que os siRNA modificados são efetivamente diferentes dos siRNA sintetizados a partir de ATP não modificados.

Ao analisar a Figura 3.5, constata-se que, ao contrário do esperado, tanto os siRNAs_ATP (poço 1) como os siRNA modificados com PEG (poço 2) parecem apresentar o mesmo tamanho (cerca de 25 pb). Tendo em conta que anteriormente, este grupo de investigação tinha provado a existência da modificação no ATP_PEG utilizado para este projeto, estes resultados levam-nos a questionar se a modificação do ATP_PEG se manteve após o processo de transcrição e digestão. Note-se que, durante estes processos são utilizados componentes com sais iónicos (NaCl por exemplo), os quais podem eventualmente competir com o PEG e assim remover a modificação inicialmente induzida. No entanto, à partida, não se pode afirmar que as moléculas não são diferentes entre si. De facto, a diferença de tamanhos entre o siRNA_ATP e o siRNA_PEG pode ser suficientemente pequena para,

nas condições utilizadas, não ser detetada em gel. Assim, impunha-se a necessidade de utilizar uma técnica mais sensível que nos possa dar mais indicações sobre a presença ou não de bases modificadas nos siRNA. Nesse sentido, amostras de siRNA_ATP e siRNA_PEG foram analisadas no *Bioanalyzer*, uma electroforese capilar baseada em tecnologia de microprocessador. No entanto, os resultados obtidos não foram conclusivos.

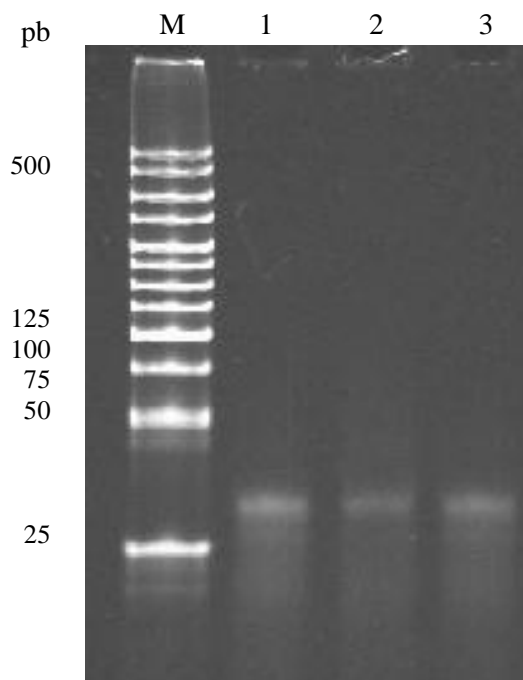


Figura 3.5 Análise electroforética, através de gel de poliacrilamida 20% (m/v), durante 3,5 h a 110 V, de siRNAs obtidos após a digestão de dsRNA por uma RNase III.
M- Marcador molecular *Hyperladder V* (Bioline); 1- siRNA_ATP; 2- siRNA_PEG; 3- siRNA_ATP+PEG

Com o objetivo de verificar se o PEG, por si só e sem ser incorporado na cadeia de dsRNA, afeta a migração de siRNAs não modificados, adicionou-se PEG a uma amostra de siRNA_ATP. Assim, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, a mesma quantidade de siRNA_ATP sem PEG (poço 1) e com PEG (poço 3) foi analisada (Figura 3.5). Ao observar o gel obtido, verifica-se que as duas bandas apresentam uma migração similar, o que parece confirmar a ideia de que, sem ser incorporado na sequência de dsRNA, o PEG, por si só, não afeta a migração dos siRNA_ATP. No entanto, e apesar de este ser o resultado esperado, o tamanho apresentado pela banda de siRNA_PEG (poço 2) leva-nos a ressaltar a hipótese de, também neste caso, a interferência do PEG na migração dos siRNAs não ter sido detetada.

Ao observar atentamente a Figura 3.5, o tamanho das bandas de siRNAs parecem ter um tamanho superior aos 25 pb esperados. Este resultado, tal como documentado por Barone e seus colegas deve-se ao facto de a mobilidade electroforética das cadeias duplas de DNA (usadas no marcador molecular) ser maior que a de cadeias duplas de RNA com igual peso molecular (Barone et al., 2000).

Após a síntese de siRNAs modificados e não modificados, e tendo em vista a caracterização *in vitro* dos primeiros, procedeu-se de seguida à transfeção de células MCF-7/eGFP com os mesmos. Assim, pretendia-se utilizar os siRNAs para silenciar a expressão de eGFP na referida linha celular, comparando a fluorescência emitida pelas células transfectadas com siRNAs comerciais, siRNAs_ATP e com siRNA_PEG.

3.3 Avaliação dos níveis de expressão da eGFP

3.3.1 Transfeção

A transfeção é uma técnica frequentemente utilizada em biologia molecular e celular, que permite a introdução de material genético (DNA ou RNA) em células eucariontes.

Neste trabalho, células MCF-7 que expressam constitutivamente eGFP foram transfectadas com siRNAs comerciais e com siRNAs sintetizados *in vitro*. Esta linha celular foi já descrita como uma linha de difícil transfeção (Appasani, 2005; Shen et al., 2003) pelo que, e como os siRNAs por si só são incapazes de atravessar a membrana celular, foi escolhido o reagente de transfeção Lipofectamine®RNAiMAX, que se pretende facilitar a internalização dos siRNAs para o meio intracelular. Este produto foi especificamente concebido para a transfeção de siRNAs e foi escolhido uma vez que está descrito na literatura como estando associado a uma elevada eficiência de transfeção e baixos níveis de toxicidade (Zhao et al., 2008).

A densidade celular utilizada no momento da transfeção é um fator importante, uma vez que se for muito reduzida afeta negativamente o crescimento das células devido à inexistência de contacto célula-a-célula, enquanto em densidades celulares demasiado elevadas, as células podem-se tornar resistentes à internalização dos ácidos nucleicos (www.promega.com). Assim, e segundo recomendações do fabricante, neste trabalho a densidade celular utilizada foi de 1×10^5 células/mL.

Outro fator que parece influenciar a eficiência de transfeção é o tempo de complexação entre o siRNA e a Lipofectamine®RNAiMAX. De facto, o complexo siRNA- Lipofectamine®RNAiMAX não se forma imediatamente à sua mistura, pelo que, e baseado em estudos feitos anteriormente com outro lípido catiónico homólogo, o tempo de complexação escolhido foi de 20 minutos (Dalby et al., 2004).

Os primeiros ensaios de transfeção foram realizados com alterações ao protocolo, tendo sido utilizado meio completo tanto para diluir as células como para formar os complexos siRNA:*Lipofectamine*[®]*RNAiMAX* (Figura 3.6).

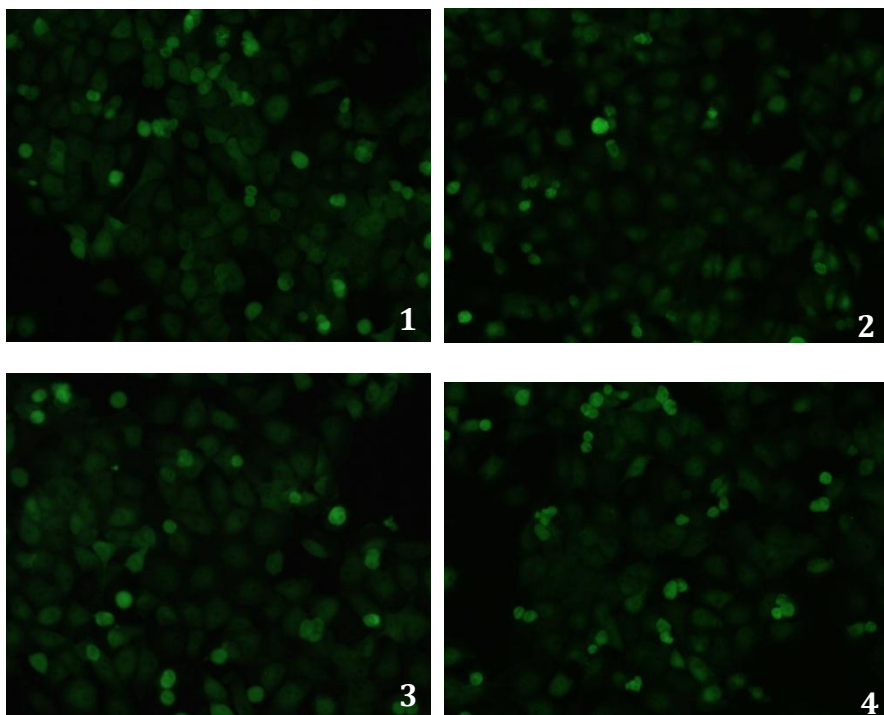


Figura 3.6 Células MCF-7/*eGFP* 48h após a transfeção com os siRNAs comerciais na presença de 7,5 μ L de lipofectamina, vistas ao microscópio num filtro de fluorescência com uma ampliação de 10x.

1 – Células Controlo (sem siRNA); 2- Células transfetadas com 5 nM de siRNA, 3- Células transfetadas com 10 nM de siRNA; 4 - Células transfetadas com 35 nM de siRNA

Como se pode observar, o nível de fluorescência é semelhante para todas as condições testadas, permitindo inferir que o silenciamento não ocorreu. Este resultado pode ser justificado com a presença, durante a complexação siRNA:*Lipofectamine*[®]*RNAiMAX*, de inibidores de transfeção presentes no soro do meio completo (Dalby et al., 2004), pelo que em ensaios futuros se optou por realizar a complexação com meio em que a quantidade de soro é reduzida em cerca de 50%. Além disso, e uma vez que durante a transfeção as células ficam mais permeáveis, a presença de antibióticos no meio de transfeção pode aumentar a citotoxicidade provocada pela transfeção (www.invitrogene.com). Assim, além de se ter substituído o meio completo durante a complexação do siRNA:*Lipofectamine*[®]*RNAiMAX*, passou-se a fazer a diluição das células em meio DMEM suplementado apenas com 10% (v/v) de FBS (portanto sem antibiótico).

As alterações produzidas pareceram surtir algumas, apesar de pouco significativas, melhorias nos resultados. Após a entrada na célula, a ação dos siRNA não é imediata, tendo de aceder à maquinaria endocelular que promove o silenciamento de mRNAs alvo. Assim, na tentativa de otimizar os resultados obtidos e no sentido de averiguar o tempo necessário para ocorrer o silenciamento da eGFP, observaram-se as células 24, 48 e 72h após a transfeção com concentrações diferentes de

siRNA. Na Figura 3.7 podem ser observados os resultados obtidos com 2 das concentrações testadas (10 e 35 nM), tendo-se verificado que os resultados para as outras concentrações de siRNA utilizadas foram muito similares.

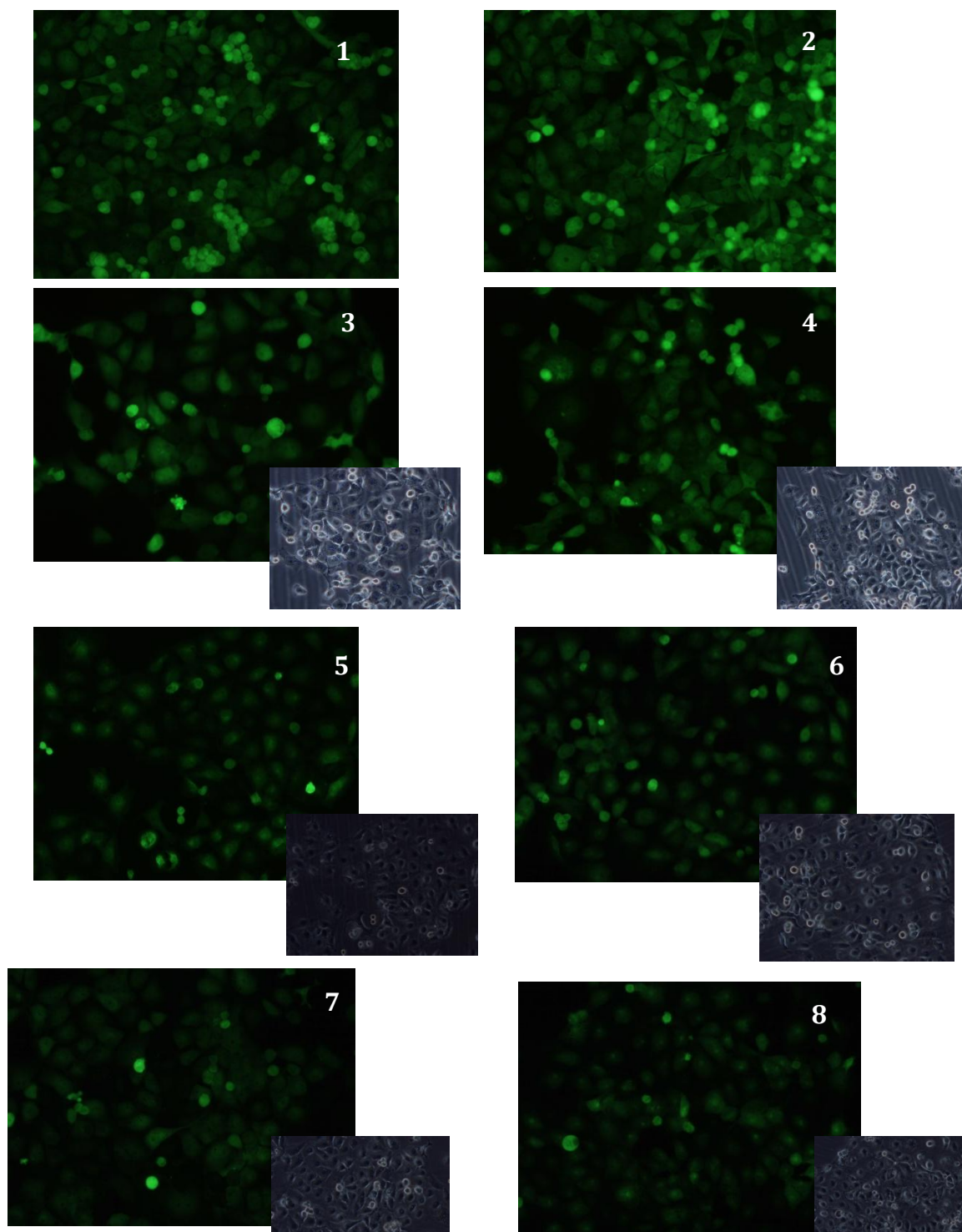


Figura 3.7 Células MCF-7/eGFP observadas no filtro de fluorescência e em campo claro, com uma ampliação de 10x, com 7,5 μ L de lipofectamina e 10 nM de siRNA comercial (à esquerda) e 35 nM de siRNA comercial (à direita).

1, 2 – Células controlo (sem siRNA); 3,4- Células observadas 24h após a transfeção; 5,6 – Células observadas 48h depois da transfeção; 7,8 – Células observadas 72h após a transfeção.

Este estudo permitiu concluir que às 24 h, o nível de expressão da fluorescência da eGFP não se alterava muito relativamente aos controlos. Por outro lado, o nível de fluorescência 48 h depois da transfeção com siRNAs comerciais evidenciou um ligeiro decréscimo na fluorescência das células, tendência que não pareceu alterar-se até às 72 h. Estes resultados vão de encontro aos obtidos por outros grupos de investigação, os quais verificaram que a degradação de mRNA por siRNAs atinge o seu máximo entre as 36 e as 48 h, começando a diminuir após as 96 h (Layzer et al., 2004). Assim, e tendo estes resultados em consideração estipulou-se que, tal como planeado no início, a expressão da eGFP seria analisada sempre 48h após a transfeção.

De seguida, e tendo verificado na literatura que a eficácia do silenciamento era influenciada pela razão de siRNA:*Lipofectamine*[®]*RNAiMAX* foram feitos vários ensaios em que se utilizaram diferentes concentrações de siRNA (de 5 nM a 100 nM) e diferentes volumes de *Lipofectamine*[®]*RNAiMAX* (de 3 µL a 10 µL em placas de 24 poços). Os resultados obtidos permitiram concluir que o nível de silenciamento parecia maior para quantidades mais baixas de *Lipofectamine*[®]*RNAiMAX* (Figura 3.8).

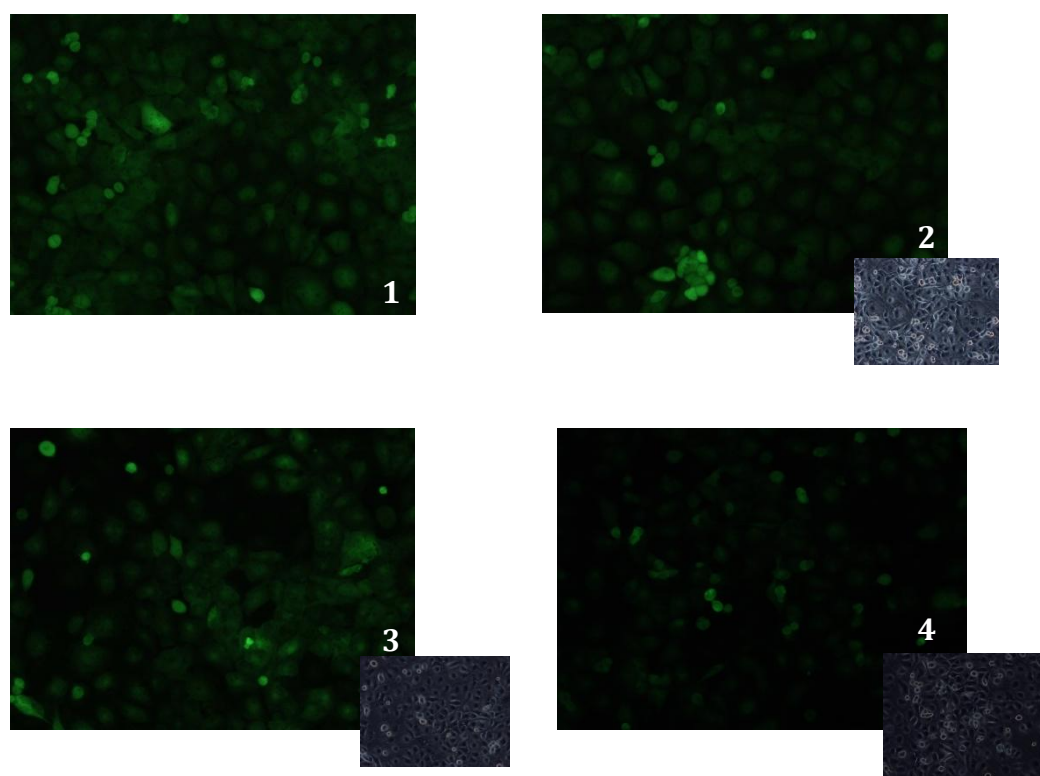


Figura 3.8 Imagens de MCF-7/eGFP observadas ao microscópio através de um filtro de fluorescência e de campo claro, com uma ampliação de 20x.

1- Células-controlo; 2- Células transfetadas com 5 µL de lipofectamina e 100 nM de siRNA comercial; 3- células transfetadas com 3 µL de lipofectamina e 100 nM de siRNA; 4- células transfetadas com 3 µL de lipofectamina e 35 nM de siRNA

Uma vez que a análise da expressão da eGFP por microscopia não permitiu tirar ilações conclusivas sobre as melhores condições a utilizar para o silenciamento, a expressão da eGFP foi

então quantificada por espectrofluorimetria. Os resultados obtidos parecem indicar haver uma tendência para um maior silenciamento com concentrações mais baixas de siRNA. Assim, nos estudos posteriores de espectrofluorimetria, estabeleceu-se que a concentração de siRNAs deveria variar entre 5 nM e 35 nM.

3.3.2 Quantificação dos níveis de expressão da eGFP

Para quantificar os níveis de expressão da eGFP, procedeu-se inicialmente à construção de uma reta padrão a partir de valores de absorvância obtidos para soluções de BSA com concentrações crescentes conhecidas (Figura 3.9). Esta reta padrão foi depois utilizada para calcular a quantidade de proteína total presente nos lisados, permitindo assim normalizar os valores de fluorescência emitida pela eGFP.

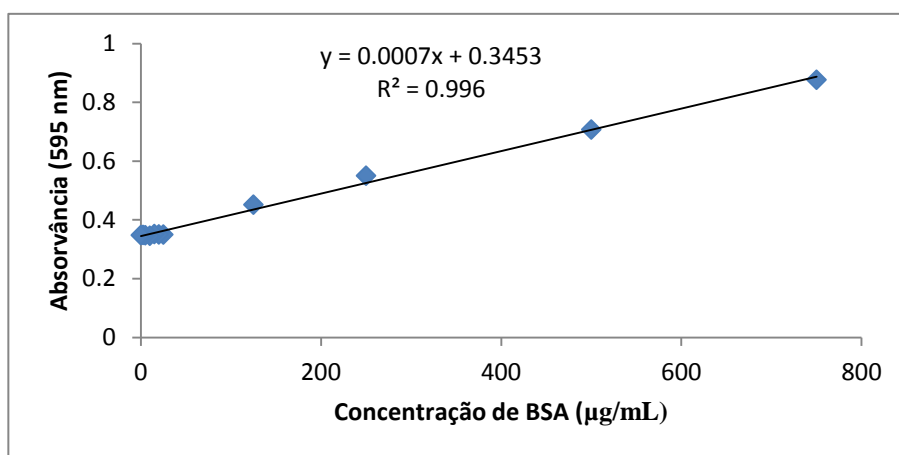


Figura 3.9 Reta padrão aplicada à determinação da quantidade de proteína total presente nas células transfetadas e células controlo.

A reta padrão foi construída a partir dos valores de absorvância medidos para uma série de diluições sucessivas, preparadas a partir de uma solução de BSA de concentração 2 mg/mL.

Uma vez calculados os valores de proteína total das amostras, foram de seguida determinados os níveis de expressão de eGFP. De forma a perceber quais as condições mais propícias para um maior silenciamento da expressão desta proteína, testaram-se diferentes concentrações de siRNA e 3 quantidades diferentes de *Lipofectamine*[®] *RNAiMAX* (Figura 3.10).

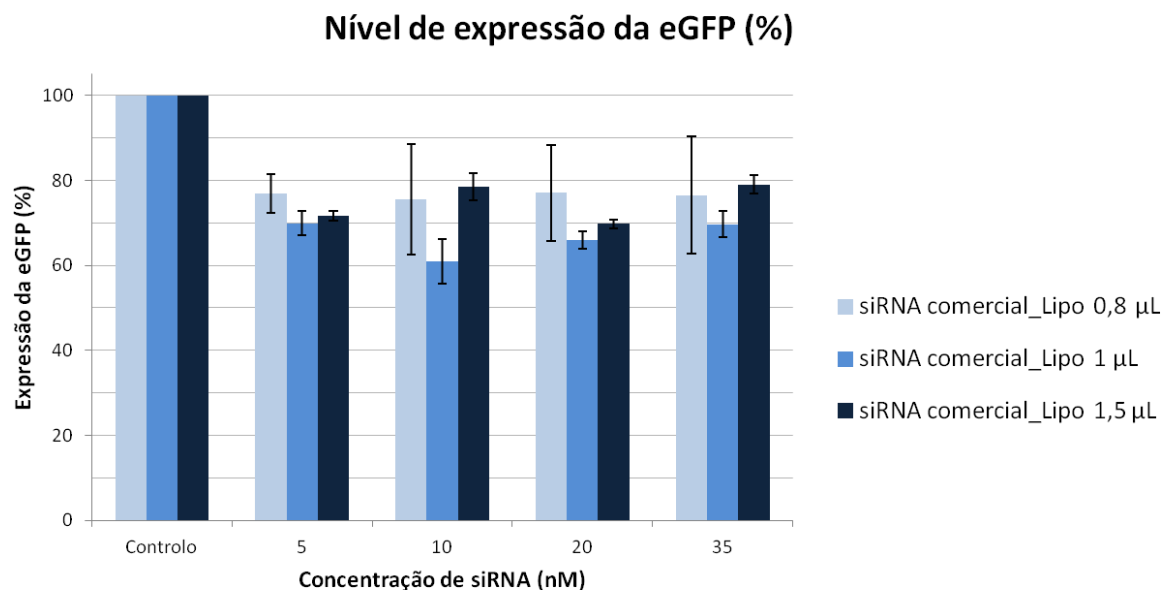


Figura 3.10 Variação dos níveis de expressão da eGFP, determinado 48h depois da transfecção com diferentes quantidades de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX e de diferentes concentrações de siRNAs. Os resultados referem-se à média de três ensaios feitos independentemente, tendo-se normalizado os valores de expressão da eGFP em relação às células incubadas sem siRNA (células controlo)

Os resultados obtidos por espectrofluorimetria confirmaram os resultados obtidos por microscopia, ou seja, o silenciamento induzido pelos siRNAs comerciais é pouco significativo. Observando o gráfico obtido, verifica-se que o nível de expressão de eGFP é bastante elevado em todas as condições testadas, o que significa que o silenciamento da proteína não foi eficiente. Como já foi explicado, estes resultados não eram de todo inesperados. De facto, tal como já foi referido, esta linha celular é tipicamente de difícil transfecção (Appasani, 2005; Shen et al., 2003).

Note-se que, relativamente ao controlo, a maior diminuição da expressão da proteína parece verificar-se para 1 µL de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX e para uma concentração 10 nM de siRNA comercial. Neste caso, relativamente ao controlo houve uma diminuição da expressão de eGFP de cerca de 40%. De facto, para todas as concentrações de siRNA testadas, parece haver uma tendência, embora muito pouco significativa, para um maior silenciamento quando foi utilizado 1µL de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX. Por esta razão, e uma vez que esta quantidade de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX não afeta a viabilidade das células transfetadas (ver secção 3.4), os ensaios subsequentes em que se analisou o silenciamento produzido pelos siRNA_ATP e pelos siRNA_PEG foram realizados às concentrações testadas, com 1 µL de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX (Figura 3.11).

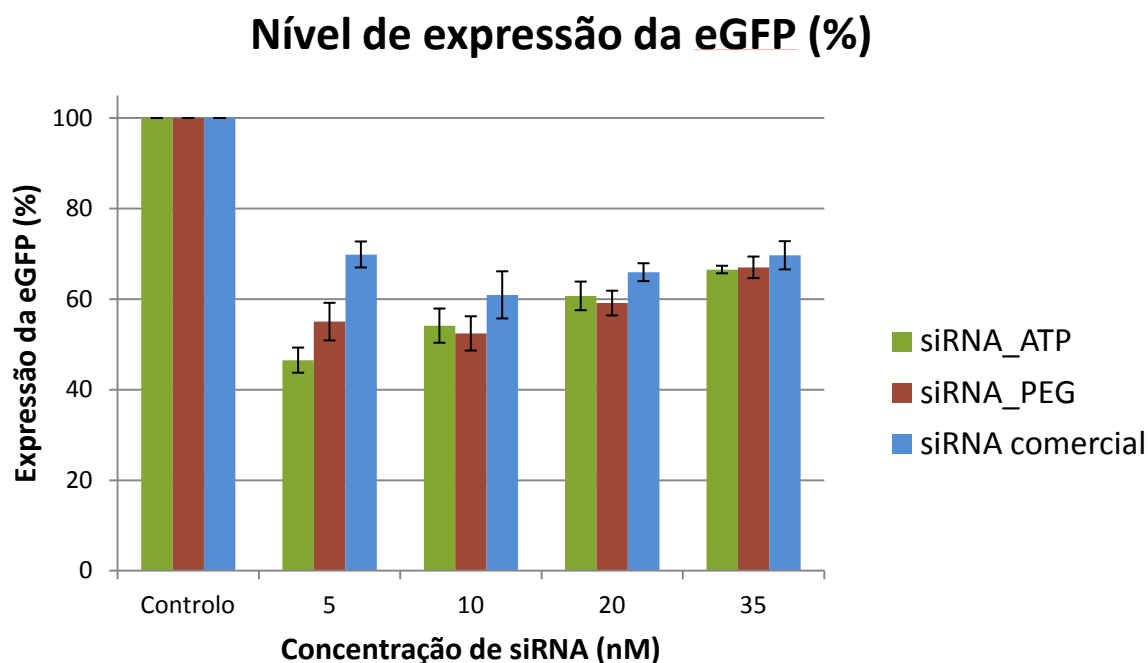


Figura 3.11 Variação do nível de expressão de eGFP após a transfeção das células MCF-7 com 1 μ L de *Lipofectamine*[®] RNAiMAX e com várias concentrações de siRNA comercial, siRNA_ATP e siRNA_PEG. Os resultados referem-se à média de três ensaios feitos, tendo-se normalizado os valores de expressão da eGFP em relação às células incubadas sem siRNA (células controlo)

Ao observar o gráfico da Figura 3.11 verifica-se que, principalmente no que diz respeito às concentrações mais baixas de siRNA, o nível de silenciamento promovido pelos siRNAs comerciais, ao contrário do que era esperado, é menor do que o nível de silenciamento induzido pelos siRNAs sintetizados *in vitro* (siRNA_ATP e siRNA_PEG). Veja-se que quando se usou 5 nM de siRNAs, o silenciamento promovido pelos siRNA_ATP e siRNA_PEG silenciaram cerca de 50% (55% e 45% respetivamente) da expressão de eGFP, enquanto os siRNAs comerciais não conseguiram silenciar mais do que 30% da expressão da fluorescência emitida pela proteína. Nesta fase é importante salientar que, durante a digestão dos dsRNA, a RNase III corta a sequência de forma aleatória, originando um conjunto de siRNAs, todos diferentes entre si. Assim, uma das possíveis justificações para este resultado prende-se com o facto de, no caso dos siRNA_ATP e dos siRNA_PEG, se ter transfetado um conjunto de oligonucleótidos diferentes que podem silenciar não só a região alvo, como também outras regiões que de alguma forma possam interferir na expressão da proteína. Ou seja, no caso dos siRNAs sintetizados *in vitro*, não se introduz na célula uma única sequência de siRNAs, mas várias sequências diferentes entre si. Isto significa que várias sequências de siRNAs podem ser complementares com várias regiões do gene que codifica para a eGFP, aumentando assim a probabilidade de se conseguir silenciar a expressão do gene e, consequentemente reduzir a fluorescência emitida pela proteína eGFP. Deste modo, e apesar de a sequência de siRNAs comercial estar validada, podemos estar perante o caso em que durante a síntese de siRNAs se tenham formado

sequências mais específicas no silenciamento da eGFP, relativamente à sequência do siRNA comercial.

Ao incorporar o nucleótido modificado, a complementaridade de bases não é comprometida, pelo que, antes de realizar os ensaios de transfeção se esperava que o nível de silenciamento seria idêntico entre o siRNA_ATP e o siRNA_PEG. De facto, pela análise da Figura 3.11, verifica-se que o nível de silenciamento promovido por estas moléculas é muito similar, tendendo a ser maior para as concentrações menores de siRNA, nomeadamente para 5 nM. Efetivamente, e após uma observação cuidada da figura, verificou-se que os melhores resultados de silenciamento foram conseguidos quando as células foram transfetadas com 5 nM de siRNA, verificando-se que o nível de silenciamento vai diminuindo gradualmente consoante a concentração de siRNAs vai aumentando. Note-se que, para a concentração mais elevada de 35 nM de siRNAs os 3 tipos de siRNAs utilizados apresentam um nível de silenciamento muito similar de aproximadamente 30%. Assim, este parece ser um caso evidente de saturação do RISC e/ou da maquinaria endocelular envolvida na via do RNAi. De facto, já foi demonstrado que o RISC tem uma capacidade limitada de incorporar os siRNAs provenientes do meio extracelular. Assim, aumentando a concentração de siRNAs, o número de complexos RISC na célula vai aumentando de forma estequiométrica. No entanto, a certa altura, não é possível aumentar mais a concentração de RISC na célula pelo que, mesmo que se adicione uma maior concentração de siRNAs, a célula não vai ser capaz de os processar a todos e o nível de silenciamento do gene alvo estanca (Grimm e Kay, 2007; Hutvagner et al., 2004). Mais ainda, foi já demonstrado que, quando em quantidades mais elevadas, os siRNAs podem competir entre si pela incorporação na via de RNAi inibindo desta forma a eficácia de silenciamento uns dos outros, o que se reflete na diminuição do silenciamento da expressão do gene alvo (Bitko et al., 2005).

3.4 Estudos de viabilidade celular

A ocorrência de silenciamento não específico por parte dos siRNAs está amplamente documentada na literatura, verificando-se muitas vezes o silenciamento de genes essenciais à viabilidade celular. Além disso, os lípidos catiónicos, como agentes de transfeção estão normalmente associados à ocorrência de citotoxicidade. Assim, de forma avaliar a citotoxicidade promovida pela presença de *Lipofectamine*®RNAiMAX e para garantir que a transfeção dos siRNAs testados não comprometia a viabilidade celular, procedeu-se à realização de ensaios MTS/PMS.

Para a avaliação da citotoxicidade promovida pelo lípido catiónico, a transfeção foi feita com volumes crescentes de *Lipofectamine*®RNAiMAX (0,8 µL, 1 µL, 1,2 µL e 1,5 µL). Assim, 48h após a transfeção foi determinada a percentagem de células viáveis para cada condição testada (Figura 3.12). Como se pode verificar, a taxa de viabilidade celular, independentemente dos volumes testados é sempre de 100%, indicando que este produto de transfeção não induz citotoxicidade.

Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Zhao e seus colegas (2008) para outras linhas celulares.

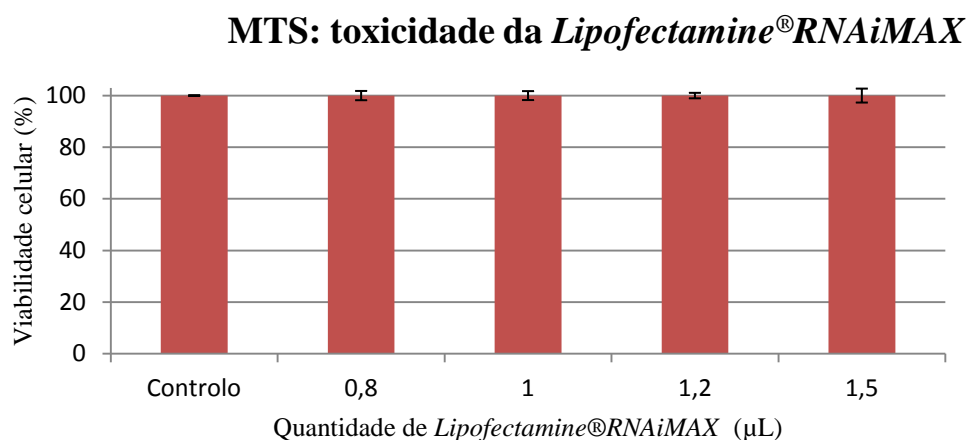


Figura 3.12 Viabilidade celular após a transfeção de células MCF-7/eGFP com diferentes volumes de lipofectamina.

Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes, tendo-se normalizado os valores de viabilidade celular em relação às células incubadas sem lipofectamina (células controlo)

Após a verificação de que a *Lipofectamine*[®]RNAiMAX, para os volumes usados, não exercia nenhum efeito citotóxico sobre as células MCF-7, procedeu-se à avaliação da taxa de viabilidade celular em células transfetadas com siRNAs comerciais (Figura 3.12).

Os resultados obtidos indicam uma redução de viabilidade celular muito pouco significativa, não ultrapassando os 13% (Figura 3.12). Assim, constata-se que o efeito citotóxico dos siRNAs comerciais é muito pouco significativo, independentemente do volume de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX ou da concentração de siRNAs comerciais testados. Assim, é possível inferir que estes siRNAs não induzem de forma significativa o silenciamento de genes essenciais à viabilidade celular. Caso isto acontecesse, poderia ocorrer uma série de eventos que promovesse a morte celular e consequentemente uma diminuição das taxas de viabilidade celular relativamente ao controlo.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.13 e indicam que os siRNAs usados para a transfeção não têm efeito citotóxico significativo sobre as células MCF-7/eGFP. É de salientar que, para as condições testadas, a viabilidade é quase sempre de 100%, nunca atingindo valores inferiores a 93% (para 20 nM de siRNA_PEG).

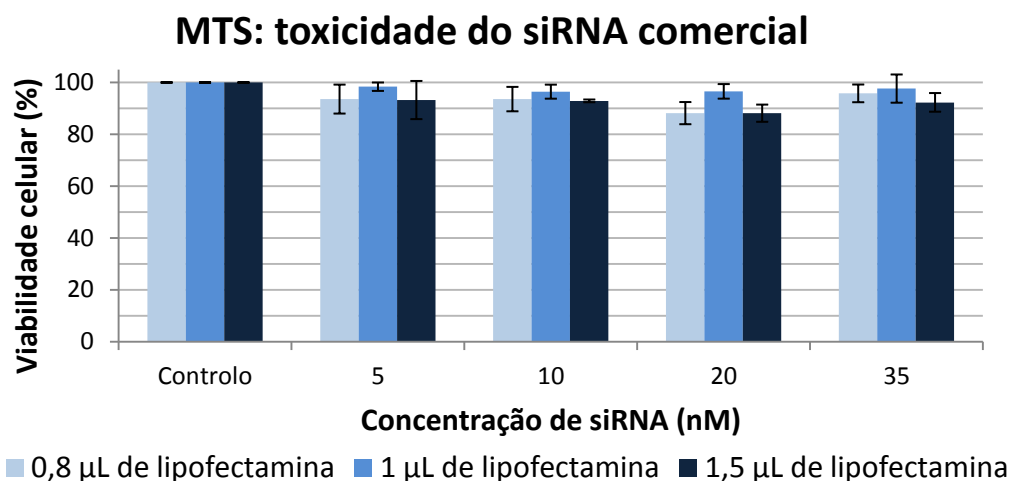


Figura 3.13 Viabilidade celular após a transfeção de células MCF-7/eGFP com diferentes volumes de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX e concentrações crescentes de siRNAs comerciais.

Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média. Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem siRNA (células controlo)

Tendo avaliado a toxicidade dos siRNAs comerciais, esta foi comparada com a toxicidade provocada pelos siRNAs sintetizados *in vitro*. Note-se que, tendo em conta que foram usados siRNAs modificados ionicamente, é importante averiguar se estes têm algum impacto ao nível da viabilidade celular. Nestes ensaios, tal como foi explicado na secção anterior, a transfeção foi feita para as diferentes concentrações de siRNAs, na presença de 1 µL de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX.

A análise desta figura, permite então deduzir que, tal como já verificado para os siRNAs comerciais, os siRNAs testados não induzem de forma significativa o silenciamento de genes essenciais à viabilidade celular.

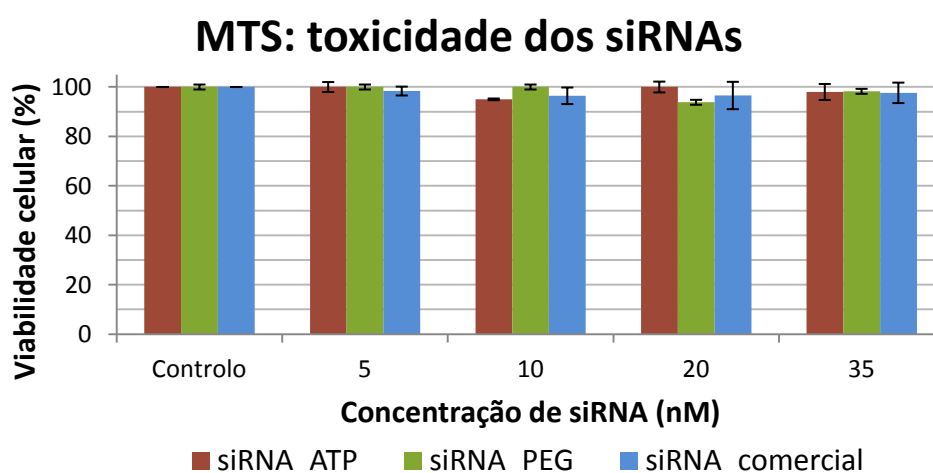


Figura 3.14 Viabilidade celular após a transfeção de células MCF-7/eGFP com diferentes volumes de *Lipofectamine*[®]RNAiMAX e concentrações crescentes de siRNAs comerciais.

Os valores apresentados são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao erro padrão em relação à média. Os valores de viabilidade celular foram normalizados em relação às células incubadas sem siRNA (células controlo)

3.5 Reação de transcriptase reversa seguida de PCR

O anião PEG foi escolhido para a modificação de ATPs entre outras razões porque favorece o estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os nucleótidos. Assim, esperava-se que, existindo silenciamento, este fosse mais duradouro.

Como já se verificou anteriormente, a modificação do ATP não interferiu na capacidade dos siRNAs silenciarem o gene que codifica para eGFP. Assim, no sentido de confirmar os resultados obtidos por espectrofluorimetria e para avaliar a estabilidade do silenciamento induzido pelos siRNAs testados, considerou-se a realização de ensaios de RT-PCR.

Assim, extraiu-se o RNA total de células MCF-7 controlo (células não sujeitas a transfeção com siRNA), a partir do qual se sintetizou cDNA. Este foi amplificado, tendo-se depois analisado os produtos de PCR por eletroforese unidimensional em gel de agarose (Figura 3.15)

Uma vez que *ACTB* é um gene *housekeeping*, escolheu-se este gene como controlo interno da reação de RT-PCR. Tal como se pode ver na imagem 3.15., a amplificação deste gene, com o par de *primers* *ACTB* (ver tabela 2.5 da secção 2.9.2) a partir do cDNA sintetizado originou um único amplicão com o tamanho pretendido de aproximadamente 270 pb.

Além disso, verificou-se que a amplificação do gene *eGFP* para as condições previamente otimizadas para a amplificação a partir de pDNA, foi também bem-sucedida.

Assim, tal como esperado, obteve-se um único amplicão com cerca de 417 pb. A observação desta figura permite comparar qualitativamente a expressão dos dois genes amplificados

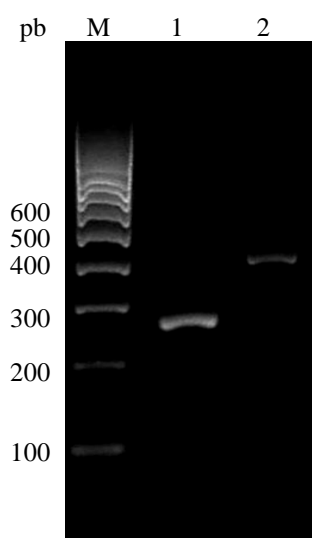


Figura 3.15 Perfil de cDNA obtido por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) M- marcador molecular *Hyperladder IV*. 1- gene *ACTB* amplificado com pares de *primers* específicos. 2- *eGFP* amplificado com par de *primers* GFP1

Dados os resultados obtidos, conclui-se que este protocolo está otimizado podendo vir a ser utilizado futuramente para comparar os níveis de mRNA *eGFP* entre amostras transfetadas com siRNAs comerciais, siRNA_ATP e siRNA_PEG.

4 Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados obtidos ao longo deste ano de trabalho revelaram ser possível sintetizar moléculas de dsRNA a partir de sequências de RNA que durante a transcrição incorporaram adenosinas ionicamente modificadas com uma molécula de PEG. Estas moléculas foram então utilizadas para sintetizar siRNAs ionicamente modificados, os quais revelaram ser capazes de induzir um nível de silenciamento semelhante ao apresentado por siRNAs não modificados. Os baixos níveis de silenciamento verificado após a transfeção dos siRNAs nas células MCF-7, que foram escolhidas para estes ensaios por apresentarem uma expressão de eGFP estável, corroboram resultados já descritos que apontam a dificuldade de transfeção nesta linha celular (Appasani, 2005; Shen et al., 2003). Assim, estes ensaios serão repetidos em linhas celulares do carcinoma colorctal humano (HCT116), após a transfeção do plasmídeo pDNA-eGFP nas mesmas. Uma vez que esta linhagem é uma linhagem de fácil transfeção, pretende-se desta forma verificar se é possível incrementar os resultados obtidos.

Foram também realizados estudos de viabilidade celular que demonstraram não ter efeitos citotóxicos sobre as células em que foram introduzidos. Estes resultados são extramente importantes uma vez que o efeito citotóxico nas células utilizadas poderia comprometer desde logo a aplicação destes siRNAs em sistemas biológicos *in vivo*.

Por último, foi otimizado o protocolo de RT-PCR para as células não transfectadas com siRNAs. Assim, no futuro, será possível a comparação entre os níveis de mRNA *eGFP* de células transfectadas com siRNAs comerciais, siRNA_ATP e siRNA_PEG. Estes ensaios permitirão também avaliar a estabilidade do silenciamento de fluorescência da eGFP promovido pelos siRNAs. Neste sentido, 24h, 48h e 72 h após a transfeção das células com os siRNAs, o RNA total será extraído das culturas transfectadas e será usado como molde para a síntese de cDNA por RT-PCR. O cDNA resultante será então amplificado por PCR, com os pares de *primers* eGFP1 e *ACTB* (ver tabela 2.1 da secção 2.2 e tabela 2. 5 da secção 2.9.2). Após eletroforese unidimensional em gel de agarose, as bandas correspondentes a cada um dos amplicões serão analisadas por densitometria pelo *software GelAnalyzer*. A expressão do gene que codifica a eGFP nas condições testadas, será então calculada através da razão entre os valores obtidos para cada condição e o obtido para o controlo interno (β -actina) (Li et al., 2010). Tendo em conta a estrutura dos siRNAs ionicamente modificados, é expectável que estas moléculas demonstrem uma maior estabilidade no ambiente celular, promovendo assim um silenciamento da expressão génica mais duradouro.

No sentido de concluir a caracterização *in vitro* dos siRNAs ionicamente modificados, e tendo em conta os resultados apresentados anteriormente, é fundamental confirmar se a modificação incorporada nos nucleótidos utilizados para a síntese de siRNAs se mantém após todo o protocolo de síntese destas moléculas. Assim, no futuro, pretende-se fazer a análise da estrutura dos siRNA sintetizados através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

5 Bibliografia

Aagaard, L., and Rossi, J.J. (2007). RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 75-86.

Appasani, K., ed. (2005). *RNA Interference Technology - From Basic science to drug development*.

Arraiano, C.M., and Fialho, A.M., eds. (2007). *O mundo do RNA* (Lisboa, Lidel).

Ashfaq, U.A., Yousaf, M.Z., Aslam, M., Ejaz, R., Jahan, S., and Ullah, O. (2011). siRNAs: potential therapeutic agents against hepatitis C virus. *Virology* 8, 276.

Barone, F., Cellai, L., Matzeu, M., Mazzei, F., and Pedone, F. (2000). DNA, RNA and hybrid RNA-DNA oligomers of identical sequence: structural and dynamic differences. *Biophys Chem* 86, 37-47.

Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50-55.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.

Chen, Z., Indjeian, V.B., McManus, M., Wang, L., and Dynlacht, B.D. (2002). CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev Cell* 3, 339-350.

Couzin, J. (2002). Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 298, 2296-2297.

Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J.A., Sachidanandam, R., *et al.* (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 453, 798-802.

Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., and Ciccarone, V.C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33, 95-103.

Davidson, B.L., and McCray, P.B., Jr. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 12, 329-340.

Dillon, C.P., Sandy, P., Nencioni, A., Kissler, S., Robinson, D.A., and Van Parijs, L. (2005). Rnai as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes. *Annu Rev Physiol* 67, 147-173.

Ding, S.W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.

Dorsett, Y., and Tuschl, T. (2004). siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 3, 318-329.

Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 457-467.

Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med* 9, 833-842.

Ferraz, R., Branco, L.C., Prudencio, C., Noronha, J.P., and Petrovski, Z. (2011). Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients. *ChemMedChem* 6, 975-985.

Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., and Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15, 331-341.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Gaynor, J.W., Campbell, B.J., and Cosstick, R. (2010). RNA interference: a chemist's perspective. *Chem Soc Rev* 39, 4169-4184.

Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Weng, Z., *et al.* (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 320, 1077-1081.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94-108.

Golden, D.E., Gerbasi, V.R., and Sontheimer, E.J. (2008). An inside job for siRNAs. *Mol Cell* 31, 309-312.

Grewal, S.I. (2010). RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr Opin Genet Dev* 20, 134-141.

Grimm, D., and Kay, M.A. (2007). Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J Clin Invest* 117, 3633-3641.

Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.

Hannon, G.J., and Rossi, J.J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.

Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 22-32.

Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98.

Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-637.

Kaikkonen, M.U., Lam, M.T., and Glass, C.K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* 90, 430-440.

Knowles, J.R. (1980). Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annu Rev Biochem* 49, 877-919.

Laus, G., Bentivoglio, G., Schottenberger, H., Kahlenberg, V., Kopacka, H., Röder, T., and Sixta, H. (2005). Ionic Liquids: current developments, potential and drawbacks for industrial applications. *Lenzinger Berichte* 84, 71-85.

Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A., and Sullenger, B.A. (2004). In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 10, 766-771.

Leung, R.K., and Whittaker, P.A. (2005). RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 107, 222-239.

Li, Y., Liu, J., and Li, Q. (2010). Mechanisms by which the antitumor compound di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamate)tin(IV) induces apoptosis and the mitochondrial-mediated signaling pathway in human cancer SGC-7901 cells. *Mol Carcinog* 49, 566-581.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.

Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14, 1605-1619.

Mattick, J.S., and Makunin, I.V. (2006). Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1, R17-29.

Moazed, D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457, 413-420.

Nishimura, N., and Ohno, H. (2002). Design of successive ion conduction paths in DNA films with ionic liquids. *J Mater Chem* 12, 2299-2304.

Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.

Okamura, K., and Lai, E.C. (2008). Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 673-678.

Perry, A.K., Chow, E.K., Goodnough, J.B., Yeh, W.C., and Cheng, G. (2004). Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* 199, 1651-1658.

Petkovic, M., Seddon, K.R., Rebelo, L.P., and Silva Pereira, C. (2011). Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. *Chem Soc Rev* 40, 1383-1403.

Rio, D.C., Ares, M., Jr., Hannon, G.J., and Nilsen, T.W. (2010). Polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harb Protoc* 2010, pdb prot5444.

Ryther, R.C., Flynt, A.S., Phillips, J.A., 3rd, and Patton, J.G. (2005). siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther* 12, 5-11.

Sanz, V., Conde, J., Hernandez, Y., Baptista, P.V., Ibarra, M.R., and de la Fuente, J.M. (2012). Effect of PEG biofunctional spacers and TAT peptide on dsRNA loading on gold nanoparticles. *J Nanopart Res* 14.

Shen, C., Buck, A.K., Liu, X., Winkler, M., and Reske, S.N. (2003). Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* 539, 111-114.

Siripurapu, V., Meth, J., Kobayashi, N., and Hamaguchi, M. (2005). DBC2 significantly influences cell-cycle, apoptosis, cytoskeleton and membrane-trafficking pathways. *J Mol Biol* 346, 83-89.

Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-839.

Snove, O., Jr., and Holen, T. (2004). Many commonly used siRNAs risk off-target activity. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 256-263.

Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., and Lieberman, J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-351.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.

Stevenson, M. (2004). Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 351, 1772-1777.

Stoimenovski, J., MacFarlane, D.R., Bica, K., and Rogers, R.D. (2010). Crystalline vs. Ionic Liquid Salt Forms of Active Pharmaceutical Ingredients: a position paper. *Pharm Res* 27.

Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., and Mattick, J.S. (2010). Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 220, 126-139.

Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 30, 106-114.

Tokatlian, T., and Segura, T. (2010). siRNA applications in nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2, 305-315.

Tschuch, C., Schulz, A., Pscherer, A., Werft, W., Benner, A., Hotz-Wagenblatt, A., Barrionuevo, L.S., Lichter, P., and Mertens, D. (2008). Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC Mol Biol* 9, 60.

Uprichard, S.L. (2005). The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett* 579, 5996-6007.

van de Water, F.M., Boerman, O.C., Wouterse, A.C., Peters, J.G., Russel, F.G., and Masereeuw, R. (2006). Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug Metab Dispos* 34, 1393-1397.

Vidinha, P., Lourenco, N.M., Pinheiro, C., Bras, A.R., Carvalho, T., Santos-Silva, T., Mukhopadhyay, A., Romao, M.J., Parola, J., Dionisio, M., *et al.* (2008). Ion jelly: a tailor-made conducting material for smart electrochemical devices. *Chem Commun (Camb)*, 5842-5844.

Vijayaraghavan, R., Izgorodin, A., Ganesh, V., Surianarayanan, M., and MacFarlane, D.R. (2010). Long-term structural and chemical stability of DNA in hydrated ionic liquids. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 1631-1633.

Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., and Imai, H. (2006). Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev* 20, 1732-1743.

Whitehead, K.A., Langer, R., and Anderson, D.G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 8, 129-138.

Wilda, M., Fuchs, U., Wossmann, W., and Borkhardt, A. (2002). Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 21, 5716-5724.

www.alnylam.com.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2, E104.

Yang, D., Goga, A., and Bishop, J.M. (2004). RNA interference (RNAi) with RNase III-prepared siRNAs. *Methods Mol Biol* 252, 471-482.

Zender, L., Hutker, S., Liedtke, C., Tillmann, H.L., Zender, S., Mundt, B., Waltemathe, M., Gosling, T., Flemming, P., Malek, N.P., *et al.* (2003). Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7797-7802.

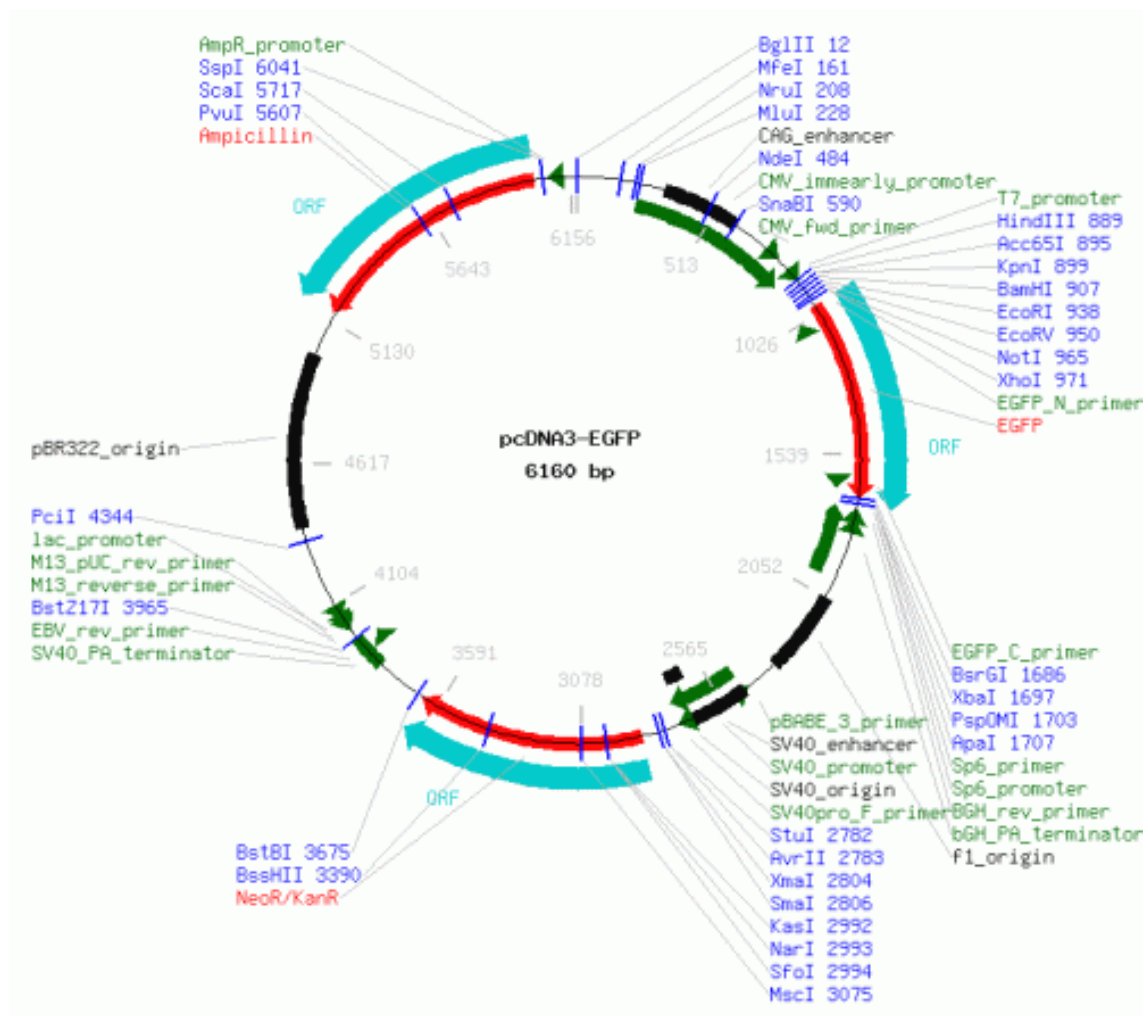
Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., San Juan-Vergara, H., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R.F., and Mohapatra, S.S. (2005). Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 11, 56-62.

Zhao, M., Yang, H., Jiang, X., Zhou, W., Zhu, B., Zeng, Y., Yao, K., and Ren, C. (2008). Lipofectamine RNAiMAX: an efficient siRNA transfection reagent in human embryonic stem cells. *Mol Biotechnol* 40, 19-26.

Zilberman, D., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.

6 Anexos

Anexo 1: Esquema representativo do plasmídeo pcDNA3-EGFP (plasmid 13031, Addgene, Massachusetts, EUA)



Anexo 2 – Sequência do gene que codifica a eGFP, destacando-se as regiões de emparelhamento dos *primers* utilizados neste trabalho, bem como o local de emparelhamento do siRNA comercial utilizado. (vermelho e sublinhado - local de emparelhamento do par de *primers* eGFP1; cinzento - local de emparelhamento do par de *primers* eGFP2; amarelo – local de emparelhamento do par de *primers* T7 eGFP; verde – local de emparelhamento do siRNA)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA
 CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA
CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGA
 CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG
 CCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
 GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
 AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATAT
 CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG
 GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGC
 CCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAC
 ATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTG